

**Phänotypische und genotypische Charakterisierung der ENU-induzierten
Mausmutante HST001 zur Verwendung für die nephrologische Forschung**

Tran Van Tuyen

Aus dem Institut für Tierzucht der Tierärztlichen Fakultät der Universität München
Lehrstuhl für Molekulare Tierzucht und Biotechnologie
Arbeit angefertigt unter Leitung von Univ.-Prof. Dr. B. Aigner
und Univ.-Prof. Dr. E. Wolf

**Phänotypische und genotypische Charakterisierung der ENU-induzierten
Mausmutante HST001 zur Verwendung für die nephrologische Forschung**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde der
Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von
Tran Van Tuyen
aus Quang binh, Vietnam

München 2004

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan: Univ.-Prof. Dr. A. Stolle

Referent: Univ.-Prof. Dr. E. Wolf

Korreferent: Univ.-Prof. Dr. B. Kaspers

Tag der Promotion: 13. Februar 2004

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Literaturübersicht	2
2.1	Bedeutung von Tiermodellen	2
2.2	Erzeugung von Mausmutanten	2
2.3	1-Ethyl-1-Nitrosoharnstoff (ENU)	5
2.3.1	Physikalische und chemische Eigenschaften	5
2.3.2	Wirkungsmechanismus	6
2.3.3	Verwendung	7
2.4	ENU-Maus-Mutagenese-Projekte	8
2.4.1	Das Münchener ENU-Maus-Mutagenese-Projekt	8
2.4.2	Weitere ENU-Screens	12
2.5	Bedeutung der Nierenerkrankungen	13
2.6	Aufbau und Funktion der Niere	14
2.6.1	Aufbau der Niere	14
2.6.2	Funktion der Niere	16
2.7	Harnstoff	19
2.7.1	Synthese	19
2.7.2	Pathophysiologie	19
2.8	Wichtige Symptome der Niereninsuffizienz	22
2.8.1	Azotämie	22
2.8.2	Urämie	22
2.8.3	Anämie	24
3	Material und Methoden	25
3.1	Versuchstiere	25

II

3.2	Phänotypische Untersuchung der Tiere	26
3.2.1	Phänotypische Gruppierung der Tiere	26
3.2.2	Untersuchung der Körpergewichtsentwicklung, Körpermaße und Organgewichte	27
3.2.3	Bestimmung der Futteraufnahme	28
3.2.4	Histologische Untersuchung	28
3.2.5	Blutentnahme und Plasmagewinnung	29
3.2.6	Bestimmung der klinisch-chemischen Parameter im Plasma und im Urin	29
3.2.7	Bestimmung der Blutbildparameter	30
3.2.8	SDS-PAGE (Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese)	30
3.3	Genomanalyse der Tiere	31
3.4	Statistische Auswertung	32
4	Ergebnisse	33
4.1	Penetranz des Merkmals und Einfluss des genetischen Hintergrundes	33
4.2	Wachstumsparameter	34
4.2.1	Körpergewichtsentwicklung	34
4.2.2	Futteraufnahme	37
4.2.3	Nasen-Rumpf-Länge	38
4.2.4	Intraabdominales Fett, Haut und Rumpf	39
4.2.5	Organgewichte	42
4.3	Histologische Untersuchung der Organe	50
4.4	Klinisch-chemische Parameter	53
4.4.1	Varianzanalyse	53
4.4.2	Harnstoff im Plasma	58
4.4.3	Harnstoff im Urin	59
4.4.4	Gesamtprotein	60
4.4.5	Triglyceride	61
4.4.6	Glukose im Plasma	62
4.4.7	Glukose im Urin	63

III

4.4.8	Amylase	64
4.4.9	Alkalische Phosphatase	65
4.5	Blutbildparameter	66
4.5.1	Varianzanalyse	66
4.5.2	Erythrozytenzahl	71
4.5.3	Hämoglobinkonzentration	72
4.5.4	Hämatokrit	73
4.5.5	Mittleres korpuskuläres Volumen	74
4.6	Albuminausscheidung im Urin der Mäuse	75
4.7	Grobkartierung der HST001 Mutation	76
5	Diskussion	79
5.1	Charakterisierung des Phänotyps der Mausmutante HST001	79
5.2	Körpergewichtsentwicklung und Wachstum	80
5.3	Klinisch-chemische Parameter	82
5.4	Blutbildparameter	86
5.5	Kartierung der Mutation	86
6	Zusammenfassung	88
7	Summary	90
8	Literaturverzeichnis	92
9	Anhang	98

Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

A	Adenin
Abb.	Abbildung
abs.	asolut
ADH	Antidiuretisches Hormon
ADP	Adenosin-5-diphosphat
ALT	Alaninaminotransferase
AMP	Adenosin-5-monophosphat
AMY	Amylase
AP	Alkalische Phosphatase
ATP	Adenosintriphosphat
ATPase	Adenosintriphosphatase
AST	Aspartataminotransferase
bp	Basenpaare
C	Cytosin
Ca	Kalzium
CHL	Chlorambucil
CHO	Cholesterin
CK	Kreatinkinase
Cl	Chlorid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dl	Deziliter
ENU	1-Ethyl-1-Nitrosoharnstoff
ES	Embryonale Stammzelle
G	Guanin
g	Gramm
GFR	Glomeruläre Filtrationsrate
GLS	Glukose
GP	Gesamtprotein
Hb	Hämoglobin
HKT	Hämatokrit

HS	Harnsäure
HST	Harnstoff
K	Kalium
kDa	Kilodalton
KG	Körpergewicht
KREA	Kreatinin
l	Liter
M	Marker
m	männlich
MCH	Mittleres korpuskuläres Hämoglobin
MCHC	Mittlere korpuskuläre Hämoglobinkonzentration
MCV	Mittleres korpuskuläres Volumen
MG	Molekulargewicht
Mg	Magnesium
mg	Milligramm
min	Minute
mmol	Millimol
μm	Mikrometer
μm^3	Kubikmikrometer
n	Anzahl der Proben
Na	Natrium
ng	Nanogramm
NRL	Nasen-Rumpf-Länge
n.s.	nicht signifikant
rel.	relativ
rpm	Umdrehungen pro Minute
P	Phosphat
p	Signifikanzniveau
pg	Pikogramm
PLT	Thrombozyten
pmol	Pikomol
RBK	Rote Blutkörperchen
s	Sekunde
s_x	Standardabweichung

T	Thymin
Tab.	Tabelle
TG	Triglyceride
U	Unit (Einheit)
\bar{x}	Mittelwert
w	weiblich
z.B.	zum Beispiel
WBK	Weißer Blutkörperchen

1 Einleitung

Modellorganismen sind wichtig, um die Funktion von Genen aufzuklären. Untersuchungen an mutanten Modelltieren liefern wertvolle Erkenntnisse zur Pathophysiologie von erblichen Erkrankungen des Menschen und zur Verbesserung der Prävention, Diagnostik und Therapie dieser Erkrankungen. Mäuse sind die wichtigsten Modellorganismen für diesen Zweck (BROWN, 1998; ANDERS und SCHLÖNDORFF, 2000).

Nierenerkrankungen stellen bei Menschen ein großes gesundheitspolitisches Problem dar. Untersuchungen an genetisch veränderten Mäusen haben viel zum Verständnis der Nierenfunktion beigetragen. Dennoch sind die komplexen Vorgänge der Regulation der Nierentätigkeit erst teilweise erforscht. Zudem reichen die bisher entwickelten Mausmodelle nicht aus, um für die nephrologischen Krankheitsbilder des Menschen adäquate Modelle bereitzustellen. Deshalb werden zusätzliche Modelle zur Erforschung der Nierenfunktion dringend benötigt.

Im Rahmen des Münchener ENU-Maus-Mutagenese-Projekts wurden zahlreiche neue mutante Mauslinien erzeugt, die Veränderungen in den klinisch-chemischen Blutparametern aufweisen. Die Mauslinie HST001 ist durch eine dominant vererbte pathologische Erhöhung der Harnstoffkonzentration im Blut der mutanten Tiere charakterisiert. Ein Anstieg des Harnstoffspiegels im Blut ist häufig durch eine schwere Einschränkung der Nierenfunktion verursacht. So sind bei einer renal bedingten Harnstofferhöhung mehr als zwei Drittel der Nephrone geschädigt (GASCHEN, 2002).

Ziel dieser Arbeit war es, die pathologischen Auswirkungen der dominanten Mutation in der Mauslinie HST001 zu charakterisieren, um dadurch die Eignung dieser Mauslinie als Tiermodell für erbliche Nierenerkrankungen des Menschen zu evaluieren. Zur Grobkartierung der kausalen Mutation im Genom wurde eine klassische Mikrosatellitenmarker-Kopplungsanalyse durchgeführt (SILVER, 1995).

2 LITERATURÜBERSICHT

2.1 Die Bedeutung von Tiermodellen

Modellorganismen sind wichtig, um die Funktion von Genen aufzuklären. Die Untersuchung verschiedener Allele eines Gens mit fehlender (loss of function), reduzierter (partial loss of function) oder verstärkter Funktion (gain of function) macht es möglich, die Feinregulation von Genen und die Bedeutung ihrer Strukturelemente zu erforschen. Während für das Verständnis grundlegender biologischer Vorgänge auch einfache Modellorganismen, wie der Fadenwurm „*Caenorhabditis elegans*“, die Fruchtfliege „*Drosophila melanogaster*“, der Krallenfrosch „*Xenopus laevis*“ oder der Zebrafisch „*Danio rerio*“ wichtige Erkenntnisse erbracht haben, bietet die Verwendung von Säugetieren wie der Maus als Tiermodell entscheidende Vorteile für das Studium krankheitsrelevanter Gene beim Menschen und tierzüchterisch interessanter Gene bei Nutztieren. Trotz ihrer enormen Bedeutung als Modellorganismen ist die Zahl der verfügbaren Mausmutanten vergleichsweise gering. Wenn auch derzeit mehr als 1000 Mutanten in den relevanten Datenbanken erfasst sind (<http://www.informatics.jax.org>), ist damit nur ein kleiner Teil der etwa 30.000 Gene eines Säugetierorganismus abgedeckt. Es besteht ein großer Bedarf an weiteren Mutanten, welche die bislang fehlenden Phänotypen (phenotype gap) ergänzen und damit eine systematische Analyse der Genfunktionen ermöglichen. Spontane Mutationen treten in der Keimbahn relativ selten auf. Man rechnet damit, dass nur etwa jede hunderttausendste Gamete an einem spezifischen Locus eine Mutation trägt, die sich in den Nachkommen in einem Phänotyp äußert. Da diese Mutationsrate für experimentelle Zwecke zu niedrig liegt, wurden verschiedene Strategien für die Erzeugung von Mausmutanten entwickelt (RATHKOLB et al., 2000b).

2.2 Erzeugung von Mausmutanten

Um die systematische Produktion von Mausmutanten zu ermöglichen, werden zwei Strategien, der Gen-basierte Ansatz und der Phänotyp-basierte Ansatz, verfolgt.

Eine Gen-basiertes Verfahren ist die Erzeugung von transgenen Tieren. Bei dieser Technik werden Kopien eines Genkonstrukts in einen Vorkern der Mauszygote injiziert, welche dann zufällig in das Wirtsgenom integrieren. Dadurch können die Auswirkungen der Überexpression des eingeführten Gens in vivo erforscht werden. Einen weiteren Gen-basierten Ansatz stellt die gezielte Mutation von Genen mit Hilfe der homologen Rekombination in embryonalen Stammzellen der Maus dar (THOMAS und CAPECCHI, 1987; RAMIREZ-SOLIS et al., 1993). Die Anwendung dieser Technik resultiert in der Erstellung von „Knockout“- oder „Knockin“-Mutanten. Ein dritter Gen-basierter Ansatz ist die Gene-trap-Strategie (EVANS et al., 1997). Dabei integriert ein künstlich eingeführtes DNA-Konstrukt zufällig in das Genom von embryonalen Stammzellen. Auf diese Weise wird eine große Anzahl von Zellenlinien erzeugt, die Mutationen in unterschiedlichen Genen tragen. Nach Identifizierung der jeweiligen Mutation kann somit für einen definierten Gen-Knockout durch Injektion der betreffenden embryonalen Stammzellen in Mäuseblastozysten eine Mausmutante hergestellt werden (WILES et al., 2000).

Der Phänotyp-basierte Ansatz ermöglicht es, mit Hilfe von Zufallsmutagenese-Strategien neue Mausmutanten mit einem interessanten Phänotyp zu etablieren. Im zweiten Schritt wird dann die auslösende Mutation und somit eine neue Genfunktion identifiziert (BROWN und PETERS, 1996). Mit diesem Ansatz wurde bereits eine große Anzahl von mutanten Phänotypen in verschiedenen Spezies erzeugt. Das mutierte Gen wird durch Kartierungsexperimente im Genom lokalisiert und durch weitere Untersuchungen (linkage analysis) identifiziert (NÜSSLEIN-VOLLHARD et al., 1980; ASHBURNER, 1989).

Man unterscheidet bei der Erzeugung von Zufallsmutationen zwischen physikalischen und chemischen Mutageneseverfahren. Bei der physikalischen Mutagenese werden die Tiere ionisierender Strahlung (Röntgen-, Gamma- oder Neutronenstrahlen) ausgesetzt. Bei der chemischen Mutagenese werden den Tieren mutagene Substanzen verabreicht, die in die Gonaden gelangen und die Keimzellen mutagenisieren. Für die Erzeugung von Mausmutanten werden Ethylnitrosoharnstoff (ENU) oder Chlorambucil (CHL) verwendet (RATHKOLB et al., 2000b). Während die Mutagenese mit ionisierender Strahlung große Deletionen erzeugt, wirkt Ethylnitrosoharnstoff (ENU) vor allem auf die prämeiotischen Spermatogonien und induziert hauptsächlich Punktmutationen. Chlorambucil verursacht größere Läsionen wie z.B. kleinere Deletionen (POPP et al., 1983; HARBACH et al., 1992) (Tab. 1).

Tabelle 1: Strategien zur Erzeugung von Mutanten (STANFORT et al., 2001)				
Mutagenese	Frequenz	Mutation	Vorteile	Nachteile
Spontan	5×10^{-6} pro Locus	Punktmutationen, Deletionen, chromosomale Rearrangements, endogene transponierbare Elemente	Sichtbarer Phänotyp	Erkennung nur von sichtbaren Phänotypen, sehr geringe Frequenz
Röntgenstrahlen (physikalisch)	$13\text{-}50 \times 10^{-5}$ pro Locus	Chromosomale Rearrangements (einfach bis komplex)	Molekularer Marker	Viele Gene betroffen
Chlorambucil (chemisch)	127×10^{-5} pro Locus	Chromosomale Rearrangements (100-500 kb Deletionen, Translokationen)	Molekularer Marker	Viele Gene betroffen
ENU (chemisch)	150×10^{-5} pro Locus	Punktmutationen	Einzelgen- Mutationen, "High throughput"- Screen	Kein molekularer Marker
Transgen / Retroviren (Insertion)	5-15% der Linien	Störung der endogenen Genexpression, chromosomale Rearrangements	Molekularer Marker	Arbeitsintensiv, kein "High throughput"- Screen
Trapping (Insertion)	100% der Linien (→ ES- Zellen)	Zerstörung von endogenen kodierenden Sequenzen	"Forward- genetics"- Strategie, einfache Klonierung, Expression	Phänotyp unvorhersehbar
Gene targeting (Insertion)	100% der Linien (→ ES- Zellen)	Design von Insertionen oder Deletionen	Design- Mutationen	Bekanntheit des Gens erforderlich, arbeitsintensiv, Phänotyp unvorhersehbar

2.3 1-Ethyl-1-Nitrosoharnstoff (ENU)

2.3.1 Physikalische und chemische Eigenschaften

1-Ethyl-1-Nitrosoharnstoff (ENU) ist ein gelblich-rötlicher Kristall, dessen Schmelzpunkt bei 103-104°C liegt (IARC, 1972). ENU hat ein Molekulargewicht (MG) von 117,1 (BUDAVARI, 1989). Die Strukturformel von ENU ist in Abbildung 1 dargestellt.

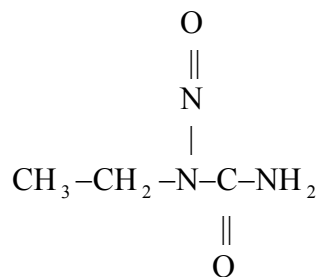


Abbildung 1: Strukturformel von ENU

Die Herstellung dieser Chemikalie erfolgt über eine Reaktion von N-Ethylharnstoff mit Salpetersäure (SHIBUYA, 1993). ENU kommt in der Natur nicht vor und wird im Labor zur Synthese von Diazoethan verwendet.

Die Stabilität von ENU ist vom pH-Wert abhängig (Tab. 2).

Tabelle 2: Stabilität von ENU bei verschiedenen pH-Werten (IARC, 1972)					
pH-Wert	4.0	6.0	7.0	8.0	9.0
Halbwertszeit (h)	190	31	1.5	0.1	0.05

ENU wird in alkalischer Lösung zu Diazoethan abgebaut. Die Halbwertszeit von ENU beträgt bei pH 7.0 und 37°C etwa 34,4 Minuten. ENU ist in Wasser als 1,3%-ige Lösung und in organischen Substanzen löslich. Im Vergleich zu den Verbindungen mit langen Alkylketten, wie 1-N-Butyl-1-Nitrosoharnstoff und 1-Isobutyl-1-Nitrosoharnstoff, ist ENU relativ wenig fettlöslich. Zudem ist es feuchtigkeit- und lichtempfindlich und sollte bei einer Temperatur unter -10°C gelagert werden (IARC, 1972; MORIMOTO et al., 1978).

2.3.2 Wirkungsmechanismus

In der Zelle wirkt ENU direkt durch die Alkylierung von Nukleinsäuren, ohne dass eine metabolische Veränderung zur Aktivierung benötigt wird (JUSTICE, 1999; SINGER und DOSAHJH, 1990). Die Ethylgruppe des ENU kann auf Sauerstoff- oder Stickstoff-Radikale in verschiedenen reaktiven Gruppen übertragen werden. Die Nukleinsäurebasen besitzen viele solche Gruppen (JUSTICE, 1999; SHIBUYA und MORIMOTO, 1993). Die übertragenen Ethylgruppen stellen an sich noch keine Mutation dar, jedoch kann es während der DNA-Replikation zu einer Fehlidentifizierung der ethylierten Base kommen. In der Folge kommt es zu einem Fehler bei der Basenpaarung und somit zum Einbau einer falschen Base in den replizierten Strang. Nach einer weiteren Replikation entsteht somit ein vollständiger Austausch eines Basenpaares (Abb. 2). Tabelle 3 gibt eine Übersicht über die Häufigkeit der verschiedenen auftretenden Basenpaarsubstitutionen. ENU induziert in erster Linie Punktmutationen, jedoch wurden auch geringgradige Deletionen beobachtet (SHIBUYA und MORIMOTO, 1993).

Zudem kann ENU in der Zelle direkte Proteinveränderungen durch die Carbamoylisierung von Aminosäuren verursachen. Die Carbamoylisierung wird durch Isocyansäure, ein stabiles Zwischenprodukt des ENU-Abbaus, als alkylierendes Agens ausgelöst. Dadurch können Störungen der Histon-Histon- und DNA-Histon-Interaktionen auftreten (JUSTICE, 1999; SHIBUYA und MORIMOTO, 1993).

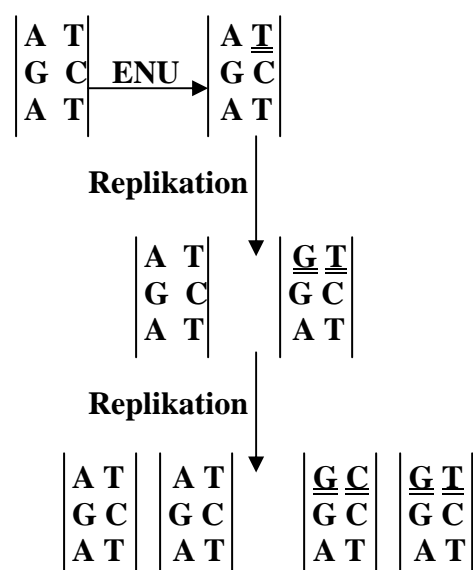


Abbildung 2: Wirkungsmechanismus von ENU
(NOVEROSKE et al., 2000)

Tabelle 3: ENU-Mutationsspektrum (NOVEROSKE et al., 2000)					
Mutation	Prämeiotische Keimzellen der Maus	Keimzellen der transgenen Maus	Prämeiotische Keimzellen von Drosophila	Postmeiotische Keimzellen von Drosophila	E. coli
AT zu TA	27/61 (44%)	36/95 (38%)	10/21 (48%)	4/37 (11%)	1/145 (1%)
AT zu GC	23/61 (38%)	10/95 (11%)	7/21 (33%)	5/37 (13%)	26/145 (18%)
GC zu AT	5/61 (8%)	35/95 (37%)	3/21 (14%)	24/37 (65%)	108/145 (74%)
GC zu CG	2/61 (3%)	2/95 (2%)	0/21 (0%)	1/37 (3%)	1/145 (1%)
AT zu CG	3/61 (5%)	3/95 (3%)	0/21 (0%)	1/37 (3%)	4/145 (3%)
GC zu TA	1/61 (2%)	6/95 (6%)	1/21 (5%)	2/37 (2%)	1/145 (1%)

2.3.3 Verwendung

ENU ist das wirksamste derzeit bekannte Mutagen zur Erzeugung von Mausmutanten (RUSSEL et al., 1979). Für diesen Zweck wird es männlichen Mäusen in einer Dosis von 80 bis 250 mg/kg Körpermasse (KM) intraperitoneal appliziert. Dies führt zur Mutagenisierung von prämeiotischen Spermatogonien der behandelten Tiere, welche dann zur Produktion von F1 bzw. G3 Nachkommen verwendet werden. Das Vorliegen von dominanten (F1) bzw. rezessiven (G3) Mutationen bei diesen Tieren wird dann mit Hilfe phänotypischer Untersuchungen nachgewiesen (RUSSEL et al., 1982; CHARLES und PRETSCH, 1987; LEWIS et al., 1991).

Die Häufigkeit einer Mutation liegt bei ca. 1/1000 (rezessive Mutation) bzw. 1/5000 (dominante Mutation) pro Locus für Gene, deren Mutation im „Spezifischen-Locus-Test“ (SLT) in einem sichtbaren Phänotyp resultiert. Die Mutationsrate hängt vom verwendeten Mausstamm, der Dosierung und von der Applikationshäufigkeit (einmalig oder mehrmalig im Abstand von einer Woche) ab. Die induzierten Mutationen führen meist zu einem partiellen Verlust der Genfunktion, es sind jedoch auch Mutationen zu erwarten, die zu einer gesteigerten Funktion oder einem völligen Funktionsverlust führen (RATHKOLB et al., 1999)

2.4 ENU-Maus-Mutagenese-Projekte

2.4.1 Das Münchener ENU-Maus-Mutagenese-Projekt

Das Münchener ENU-Maus-Mutagenese-Projekt ist ein Teil des Deutschen Humangenomprojektes und dient der systematischen Erzeugung und Charakterisierung von Mausmutanten. Es ermöglicht die Entdeckung neuer Gene und die Aufklärung ihrer Funktion, und dient somit der Etablierung von Modellen für genetisch bedingte Erkrankungen von Mensch und Tier. Die zur Phänotypisierung durchgeführten Untersuchungen erstrecken sich auf die folgenden Teilgebiete: Klinische Chemie, Hämatologie, biochemischer Metabolismus, Immunologie und Allergien, Mitochondrienkrankheiten, Dysmorphologie, lysosomale Enzyme, Geschlechts-umkehr, Schmerzempfinden und Verhalten der Tiere (SOEWARTO et al., 2000).

Veränderungen von klinisch-chemischen Parametern im Blut sind Indikatoren für spezifische Krankheitsbilder. So weist eine veränderte Enzymaktivität im Plasma auf Erkrankungen der zugehörigen Organen hin (BOYD, 1988). Die Erhöhung oder Verminderung eines spezifischen Substrats im Blut zeigt eine Störung des entsprechenden Stoffwechselweges oder der Aufnahme bzw. Ausscheidung des Substrats an (RATHKOLB et al., 2000a). Folgende Parameter wurden bei den Nachkommen der mutagenisierten Tiere untersucht, um neue Mutationen zu finden:

Enzyme: Alkalische Phosphatase (AP), Amylase (AMY), Kreatinkinase (CK), Aspartat-Amino-Transferase (AST), Alanin-Amino-Transferase (ALT).

Elektrolyte: Kalium (K), Natrium (Na), Chlorid (Cl), Kalzium (Ca), Phosphat (P).

Metabolite: Glukose (GLS), Cholesterin (CHO), Triglyceride (TG), Gesamtprotein (GP), Harnsäure (HS), Harnstoff (HST), Kreatinin (KREA).

Eine Übersicht über mögliche Ursachen für Veränderungen von Enzymaktivitäten, Elektrolyt- sowie Metabolitenkonzentrationen sind für die verschiedenen Parameter in den Tabellen 4a, 4b und 4c dargestellt.

Tabelle 4a: Ursachen für eine Erhöhung oder Verminderung der Enzymaktivität im Blut (KRAFT und SCHILLINGER, 1989)		
Enzym	Aktivität vermindert	Aktivität erhöht
Alkalische Phosphatase (AP)	<ul style="list-style-type: none"> • Vitamin D-Überdosierung 	<ul style="list-style-type: none"> • Vitamin D-Mangel • Osteoblastenvermehrung • Leberveränderung • Kalzium-Mangel • Gallengangverschluss
Amylase (AMY)	<ul style="list-style-type: none"> • Pankreasinsuffizienz • Zystische Fibrose 	<ul style="list-style-type: none"> • Akute Pankreatitis • Pankreasgangverschluss
Kreatinkinase (CK)		<ul style="list-style-type: none"> • Skelettmuskelschädigung • Muskeldystrophie
Aspartat-Amino-Transferase (AST)		<ul style="list-style-type: none"> • Lebererkrankung • Herzmuskelnekrose • Muskeldystrophie • Lungenerkrankung • Pankreatitis
Alanin-Amino-Transferase (ALT)		<ul style="list-style-type: none"> • Lebererkrankung

Tabelle 4b: Ursachen für eine Erhöhung oder Verminderung der Elektrolytkonzentration im Blut (KRAFT und SCHILLINGER, 1989)		
Elektrolyt	Konzentration vermindert	Konzentration erhöht
Kalium (K)	<ul style="list-style-type: none"> • Metabolische Alkalose • Hyperaldosteronismus • Gastroenteritis 	<ul style="list-style-type: none"> • Akute und chronische Nierenerkrankung
Natrium (Na)	<ul style="list-style-type: none"> • Chronische Nierenerkrankung • Durchfall 	<ul style="list-style-type: none"> • Körperflüssigkeitsverlust • Erhöhung des Mineralcorticosteroidhormons
Chlorid (Cl)	<ul style="list-style-type: none"> • Chronische Nierenerkrankung 	<ul style="list-style-type: none"> • Körperflüssigkeitsverlust
Kalzium (Ca)	<ul style="list-style-type: none"> • Hyperthyreoidismus • Pseudohypoparathyreoidismus • Vitamin D-Mangel • Hyperphosphatämie • Magnesium-Mangel • Akute Pankreatitis • Nierenerkrankung 	<ul style="list-style-type: none"> • Tumor
Phosphat (P)	<ul style="list-style-type: none"> • Vitamin D-Mangel • Tumor 	<ul style="list-style-type: none"> • Osteopathie • Kalzium-Mangel

Tabelle 4c: Ursachen für eine Erhöhung oder Verminderung der Metabolitenkonzentration im Blut (KRAFT und SCHILLINGER, 1989)		
Metabolit	Konzentration vermindert	Konzentration erhöht
Glukose (GLS)	<ul style="list-style-type: none"> • Störung der Glukoneogenese • Malabsorption bzw. Maldigestion • Eklampsie, Azetonämie • Insulinom 	<ul style="list-style-type: none"> • Diabetes mellitus • Pankreatitis • Stress
Cholesterin (CHO)	<ul style="list-style-type: none"> • Peroxisomenveränderung 	<ul style="list-style-type: none"> • Hyperproteinämie • Hypothyreoidismus • Nephrotisches Syndrom • Lebererkrankung • Knochenmarkstumor
Triglyceride (TG)	<ul style="list-style-type: none"> • Peroxisomenveränderung 	<ul style="list-style-type: none"> • Hypothyreoidismus • Nephrotisches Syndrom • Lebererkrankung • Knochenmarkstumor
Gesamtprotein (GP)	<ul style="list-style-type: none"> • Störung der Proteinsynthese • Leberschädigung • Magen-Darm-Tumor • Proteinverlust bei Nierenerkrankung • Mangel an Pankreasenzymen • Resorptionsstörung aus dem Darm 	<ul style="list-style-type: none"> • Plasmozytom • Chronische Entzündung
Harnsäure (HS)	<ul style="list-style-type: none"> • Mangel an Molybdän 	<ul style="list-style-type: none"> • Leberdysfunktion
Harnstoff (HST)	<ul style="list-style-type: none"> • Störung des Harnstoffzyklus 	<ul style="list-style-type: none"> • Akute und chronische Nierenerkrankung • Erhöhung der Protein-Katabolisierung
Kreatinin (KREA)		<ul style="list-style-type: none"> • Akute und chronische Nierenerkrankung

2.4.2 Weitere ENU-Screens

Neben dem Münchener ENU-Maus-Mutagenese-Projekt gibt es noch weitere wissenschaftliche und industrielle ENU-Mutagenese-Programme zur Erzeugung von noch nicht in der Literatur beschriebenen Phänotypen bei der Maus. Diese Programme konzentrieren sich teilweise auf sehr spezifische Gebiete.

Tabelle 5:
Wissenschaftliche und industrielle ENU-Mutagenese-Programme (nach RUSS et al., 2002)

ENU-Programm	Internetseite
ANU, Canberra, Australia	http://jcsmr.anu.edu.au/group_pages/mgc/MedGenCen.html
Baylor College, Houston, USA	http://www.mouse-genome.bcm.tmc.edu
Genomics Institute of the Novartis Research Foundation, San Diego, USA	http://www.gnf.org
Ingenium Pharmaceuticals AG, Germany	http://www.ingenium-ag.com
Jackson Laboratory, Bar Harbor, USA	http://www.jax.org/nmf
MRC, Harwell, UK	http://www.mut.har.mrc.ac.uk
Oak Ridge Nat. Laboratory Tennessee, USA	http://bio.Isd.ornl.gov/mouse
Phenomix, San Diego, USA	http://www.phenomixcorp.com
Tennessee, Genome Consortium, Tennessee, USA	http://Tnmouse.org
RIKEN, Yokohama, Japan	http://www.gsc.riken.go.jp/Mouse
University of Toronto, Toronto, Canada	http://www.cmhd.ca
Northwestern University, Chicago, USA	http://Genome.northwestern.edu

2.5 Bedeutung der Nierenerkrankungen

Nierenerkrankungen stellen ein großes gesundheitspolitisches Problem dar. In Deutschland sind ca. 75.000 Menschen auf eine künstliche Niere oder ein Nierentransplantat angewiesen. Zudem wächst diese Patientengruppe jährlich um 3-4%. Die entstehenden Behandlungskosten in diesem Bereich belaufen sich auf ca. 300 Millionen Euro pro Jahr. In den USA wird prognostiziert, dass bis zum Jahr 2010 ein 50%-iger Zuwachs der Nierenpatienten erfolgen wird (FLOEGE, 2003).

Bei etwa 10% der Patienten mit akutem Nierenversagen ist eine Dialysebehandlung erforderlich. Der Anteil dieser Patienten an allen Aufnahmen ins Krankenhaus liegt bei etwa 1%, im intensivmedizinischen Bereich wird er zwischen 15 und 25% angegeben. Die Häufigkeit des akuten Nierenversagens in der Gesamtbevölkerung wird auf 100 Patienten pro 1 Million Einwohner und Jahr geschätzt (GEIGER et al., 2002). Bezüglich der Häufigkeit chronischer Nierenerkrankungen rechnet man mit insgesamt 60 bis 70 Fällen pro 1 Million Einwohner im Jahr, die das finale Stadium der chronischen Niereninsuffizienz erreichen (<http://www.nephrologie.de>).

Etwa 16% aller chronischen Nierenerkrankungen bei Kindern sind erblicher Natur (FOREMAN und CHAN, 1988). Darunter fallen diverse Basalmembran-Defekte (z.B. Alport's Syndrom), strukturelle Veränderungen der Tubuli oder des Interstitiums (z.B. polyzystische Nierenerkrankung), sowie eine Reihe von metabolischen Erkrankungen, die sekundär zu einer progressiven Glomerulosklerose führen (SABORIO und SCHEINMANN, 1998). Die geographische und ethnische Häufigkeit hereditärer Nierenerkrankungen, die auf einer Einzelgenmutation beruhen, schwankt erheblich. So ist die autosomal dominante polyzystische Nierenerkrankung in Japan im Vergleich zu Europa erheblich seltener (1:4033 gegenüber 1:544). Das kongenitale nephrotische Syndrom des finnischen Typs kommt endemisch in einem Landstrich von Pennsylvania (USA) zwanzigmal häufiger vor als in Finnland, ohne dass nachgewiesene ethnische Beziehungen bestehen. In einer Region von Westschweden liegt die Prävalenz der tubulösen Sklerose bei Jugendlichen mit 15 Fällen pro 100.000 Einwohnern deutlich höher als in West- und Mitteleuropa mit drei bis sieben Patienten pro 100.000 Einwohner.

2.6 Aufbau und Funktion der Niere

2.6.1 Aufbau der Niere

Die Nierenoberfläche ist von der bindegewebigen Nierenkapsel überzogen. Das Nierenparenchym teilt sich in die Rindenschicht und das Nierenmark. Zentral liegt das Nierenbecken, in welches der Harnleiter einmündet (Abb. 3)

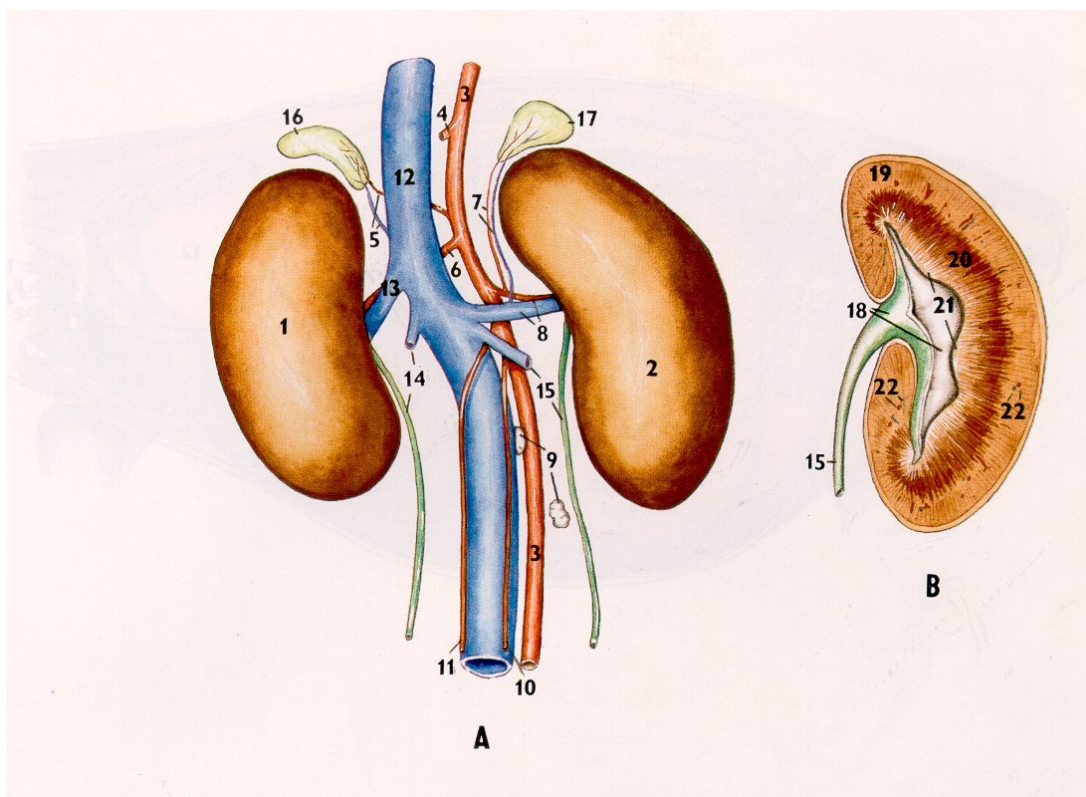


Abbildung 3: Aufbau der Mausniere (aus: A Colour Atlas of Anatomy of Small Laboratory Animals (POPESKO et al., 1982))

1	Rechte Niere	12	Hintere Hohlvene
2	Linke Niere	13	Rechte Nierenvene
3	Abdominale Aorta	14	Rechter Harnleiter
4	Vordere Gekrösearterie	15	Linker Harnleiter
5	Rechte Nebennierenarterie und -vene	16	Rechte Nebenniere
6	Rechte Nierenarterie	17	Linke Nebenniere
7	Linke Nebennierenarterie und -vene	18	Nierenbecken
8	Linke Nierenarterie und -vene	19	Nierenrinde
9	Aortalympfknoten	20	Nierenmark
10	Rechte Hodenarterie	21	Nierenpapille
11	Linke Hodenarterie	22	Subkorticale Arterien und Venen

Die funktionelle Grundeinheit der Niere ist das Nephron. Das Malpighische Körperchen setzt sich aus dem arteriellen Gefäßknäuel (Glomerulum) und einer zweiblättrigen Hülle, der Bowmanschen Kapsel, zusammen. Die Anzahl der Nephronen ist bei verschiedenen Tierarten unterschiedlich. Das viszerale Blatt der Kapsel legt sich dem Gefäßknäuel eng an, während das parietale Blatt in den Tubulus mündet. Der mittlere Durchmesser der Nephronen liegt bei Haustieren zwischen 110 und 150 μm . Der Gefäßdurchmesser der Glomerulumkapillaren liegt zwischen 5 und 13 μm (KOLB, 1980). Nach der Mündung der Bowmanschen Kapsel in ein kurzes Halsstück folgt der stark geschlängelte Tubulus contortus. Danach steigt der Tubulus in das Nierenmark ab, kehrt in der Henle-Schleife um und läuft wieder zur Rindenschicht zurück. In der Rindenschicht endet der Tubulus nach kurzer Schlängelung in einem Sammelrohr (Abb. 4).

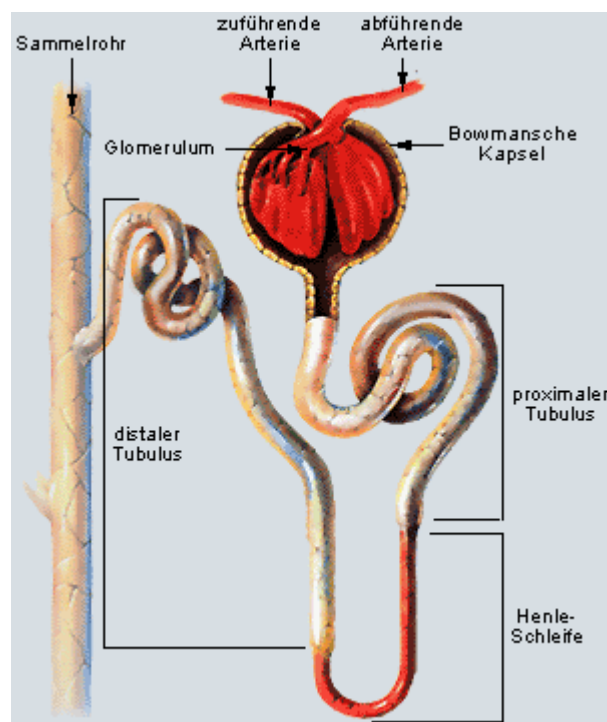


Abbildung 4: Aufbau des Nephrons
(aus: http://www.m-ww.de/krankheiten/nephrologie/anatomie_funktion.html)

Die Sammelrohre vereinigen sich und münden als Ductus papillares an der Nierenpapille in das Nierenbecken. Somit besteht die Nierenerinde aus den Nierenkörperchen, den geschlängelten Anfangs- und Endteilen der Tubuli, den ersten Abschnitten der absteigenden und den letzten Stücken der aufsteigenden Schenkel der Henle-Schleifen sowie den Anfangsabschnitten der Sammelkanälchen (KOLB, 1980; SCHEUNERT und TRAUTMANN, 1987). Den Tubulus unterteilt man in den proximalen Tubulus (Tubulus contortus I, absteigender Schenkel der Henle-Schleife), das Überleitungsstück der Henle-Schleife und den distalen Tubulus (aufsteigender Schenkel der Henle-Schleife, Tubulus contortus II).

2.6.2 Funktion der Niere

Als wichtigstes Ausscheidungsorgan ist die Niere an der Regulation des Stoffwechsels beteiligt. Durch Filtration von Wasser und gelösten Substanzen aus dem Blut und deren partielle Reabsorption werden der osmotische Druck und das Säure-Basen-Verhältnis der Körperflüssigkeiten im Gleichgewicht gehalten (Isotonie, Isoionie, Isohydrie). Darüber hinaus werden durch die Nieren körpereigene Stoffwechselprodukte sowie körperfremde Stoffe ausgeschieden. Mikropunktion des Nephrons und Clearanceuntersuchungen haben einen Einblick in den renalen Ausscheidungsmechanismus vieler Stoffe verschafft. Fast alle Elektrolyte und Nichtelektrolyte des Blutes werden glomerulär filtriert und teilweise im Tubulus rückresorbiert. In der Niere werden zusätzlich die Hormone Renin und Erythropoetin sowie $1\alpha,25$ -Dihydroxycholecalciferol gebildet (KOLB, 1980; WITTKE, 1987).

Im Nierenkörperchen werden alle Plasmabestandteile durch das Endothel der Glomerulumkapillaren ultrafiltriert. Eine maximale Filtration findet bei Stoffen mit einem Molekulargewicht (MG) von weniger als 40.000 statt. Albumin (MG: 69.000) und Globuline (MG: 70.000-900.000) treten nur in Spuren in das Ultrafiltrat über. Während die Konzentration der Elektrolyte im Ultrafiltrat durch das Donnan-Gleichgewicht bestimmt wird, weisen die Nichtelektrolyte im Ultrafiltrat die gleiche Konzentration wie im Plasma auf.

Die Zellen des proximalen Tubulus besitzen Mikrovilli, wodurch die resorptionsaktive Oberfläche um das 50-fache vergrößert ist. In den basalen Einstülpungen befinden sich zahlreiche Mitochondrien. Die Reabsorption findet sowohl trans- als auch parazellulär statt. Im proximalen Tubulus werden bereits über 98% der Glucose, der Aminosäuren und der K^+ -

Ionen, 80% der Na^+ -Ionen und 75% der Wassermoleküle des Primärfiltrats reabsorbiert. An der Rückresorption von Aminosäuren sind verschiedene Trägersysteme beteiligt. Die Wiederaufnahme von Na^+ - und Ca^{2+} -Ionen findet unter Beteiligung von Transport-ATPasen (Na-ATPase, K-ATPase, Ca-ATPase) statt.

Im dünnen absteigenden Schenkel der Henle-Schleife sind die Epithelzellen flach und enthalten nur wenig Mitochondrien. In diesem Bereich werden Wassermoleküle infolge des hohen osmotischen Drucks in der peritubulären Flüssigkeit reabsorbiert. Außerdem sind hier spezifische Harnstofftransporter (UT-A2) lokalisiert, die an der Rückresorption von Harnstoff in das Interstitium beteiligt sind (Tab. 6). Im aufsteigenden Schenkel der Henle-Schleife sind die Epithelzellen reichlich mit Mitochondrien ausgestattet. Hier ist eine hohe Aktivität an Na-K-ATPase vorhanden, so dass die Na^+ -Ionen aus den Zellen in die peritubuläre Gewebeflüssigkeit überführt werden. Der osmotische Druck im Tubuluslumen liegt in der Henle-Schleife hoch.

Im distalen Tubulus findet in Abhängigkeit von der Konzentration der Elektrolyte im Filtrat sowie vom Säure-Basen-Haushalt eine weitere Reabsorption von Na^+ - und Cl^- -Ionen sowie eine Sekretion verschiedener Ionen statt. Bedingt durch einen Überschuss an K^+ -Ionen in pflanzlichen Futtermitteln, werden bei Pflanzenfressern im distalen Tubulus K^+ - und Bikarbonat-Ionen verstärkt sezerniert. Dagegen bilden Fleischfresser meist einen Überschuss an Säure-Anionen (Phosphat, Sulfat) aus. Wegen der im distalen Tubulus stattfindenden Resorption von Na^+ - und Cl^- -Ionen sinkt der osmotische Druck im Filtrat wieder ab. Diese Reabsorption im distalen Tubulus findet im Austausch gegen K^+ - und H^+ -Ionen statt und wird durch die Mineralkortikosteroide verstärkt. Die Wiederaufnahme von Wassermolekülen im distalen Tubulus wird durch Vasopressin reguliert (KOLB, 1980; SCHEUNERT und TRAUTMANN, 1987).

Harnstoff stellt einen essentiellen Bestandteil des Urinkonzentrierungsmechanismus dar. Individuen mit starker Proteindefizienz sind unfähig den Urin zu konzentrieren. Die Infusion von Harnstoff kehrt diesen Defekt um. In der Niere lokalisierte Harnstofftransporter fördern die Rückresorption von Harnstoff ins Interstitium und bewirken somit einen Anstieg der Osmolalität der peritubulären Flüssigkeit. Es sind zwei Familien von Harnstofftransportern, UT-A und UT-B, beschrieben (Tab. 6), wobei verschiedene UT-A Isotypen im Epithel der Henle-Schleifen und Sammelkanälchen, UT-B Isotypen hingegen im Endothel der absteigenden Vasa recta lokalisiert sind (SAND, 2002; YANG et al., 2002).

Tabelle 6:
Isoformen und Lokalisation von Harnstofftransportmolekülen (SANDS, 2002)

Gen	Isoform	Lokalisation	Literatur
Slc 14a1	UT-B1 (UT3)	Erythrozyten, Vasa recta descendens	(BERGER et al., 1998; OLIVES et al., 1994; TIMMER et al., 2001; TSUKAGUCHI et al., 1997)
	UT-B2 (UT11)	Erythrozyten Vasa recta descendens	(COURIAUD et al., 1996; PROMENEUR et al., 1996; TIMMER et al., 2001)
Slc14a2	UT-A1 (UT1)	Sammelrohre im Nierenmark	(BAGNASCO et al., 2001; BRADFORD et al., 2001; SHAYAKUL et al., 1996)
	UT-A1b	Nierenmark	(BAGNASCO et al., 2000; NAKAYAMA et al., 2001)
	UT-A2 (UT2)	Dünner absteigender Schenkel der Henle- Schleife	(NIELSEN et al., 1996; OLIVES et al., 1996 ; PROMENEUR et al., 1996 ; SCHMITH et al., 1995 ; YOU et al., 1993)
	UT-A2b	Nierenmark, Herz, Leber	(BAGNASCO et al., 2000; DUCHESNE et al., 2001 KARAKASHIAN et al., 1999; DORAN et al., 1999)
	UT-A3	Sammelrohre im Nierenmark	(FENTON et al., 2000; KARAKASHIAN et al., 1999 SHAYAKUL et al., 2001; TERRIS et al., 2001)
	UT-A3b	Nierenmark	(BAGNASCO et al., 2000)
	UT-A4	Nierenmark	(KARAKASHIAN et al., 1999)
	UT-A5	Hoden	(FENTON et al., 2000)

2.7 Harnstoff

2.7.1 Synthese

Der Stickstoff-Anteil der Proteine liegt nach ihrem Abbau zu Aminosäuren und deren Desaminierung in Form von Ammonium-Ionen und Ammoniak vor. Bei pH 7.4 beträgt der NH_3 -Anteil etwa 1%. Die Toxizität des Ammoniaks ist darauf zurückzuführen, dass NH_3 -Moleküle im Gegensatz zu NH_4^+ -Ionen durch Zell-Membranen gelangen. Säugetiere wandeln Ammoniak zur Entgiftung in das nicht toxische, wasserlösliche Ausscheidungsprodukt Harnstoff ($\text{O}=\text{C}(\text{NH}_2)_2$) um (HOLZNER, 1995; LÖFFLER und PETRIDES, 2002). Der hierzu beschrittene Stoffwechselweg wird als Harnstoffzyklus bezeichnet (Abb. 5).

2.7.2 Pathophysiologie

Die Harnstoffelimination erfolgt überwiegend renal durch glomeruläre Filtration. Etwa 40-60% des filtrierte Harnstoffs diffundieren unabhängig von der tubulären Flußrate im proximalen Tubulus zurück. Die Rückdiffusion im distalen Tubulus ist abhängig vom Urinfluss und wird über das antidiuretische Hormon (ADH) gesteuert. Bei Diurese diffundieren etwa 40% des im distalen Filtrat vorhandenen Harnstoffs zurück.

Im Kindesalter besteht ein erhöhter Eiweißbedarf für das Wachstum. Die Harnstoffwerte im Blut sind deshalb niedriger als bei Erwachsenen (WITT et al., 1982). Bei prä- und postrenaler Niereninsuffizienz ist gegenüber dem akuten Nierenversagen der tubuläre Harnfluss vermindert (SCHMIDT und THEWS, 1993). Aufgrund der Abhängigkeit vom Eiweißstoffwechsel und von den komplexen renalen Ausscheidungsverhältnissen besteht ein weiter physiologischer Referenzbereich für Harnstoff im Serum. Deshalb ist seine Bestimmung ein wenig spezifischer und empfindlicher Parameter zur Beurteilung einer beginnenden glomerulären Funktionseinschränkung. Erst bei einer Abnahme der glomerulären Filtrationsrate um 75% kommt es zu einem Anstieg des Serum-Harnstoffspiegels. Der Serumharnstoffspiegel ist im Gegensatz zum Serumkreatininspiegel von mehreren Faktoren abhängig. Er variiert mit dem Proteingehalt der Nahrung, dem Grad des Katabolismus, der Höhe des Glomerulumfiltrats und der aktuellen Diurese (CHEW und DIBATOLA, 1996).

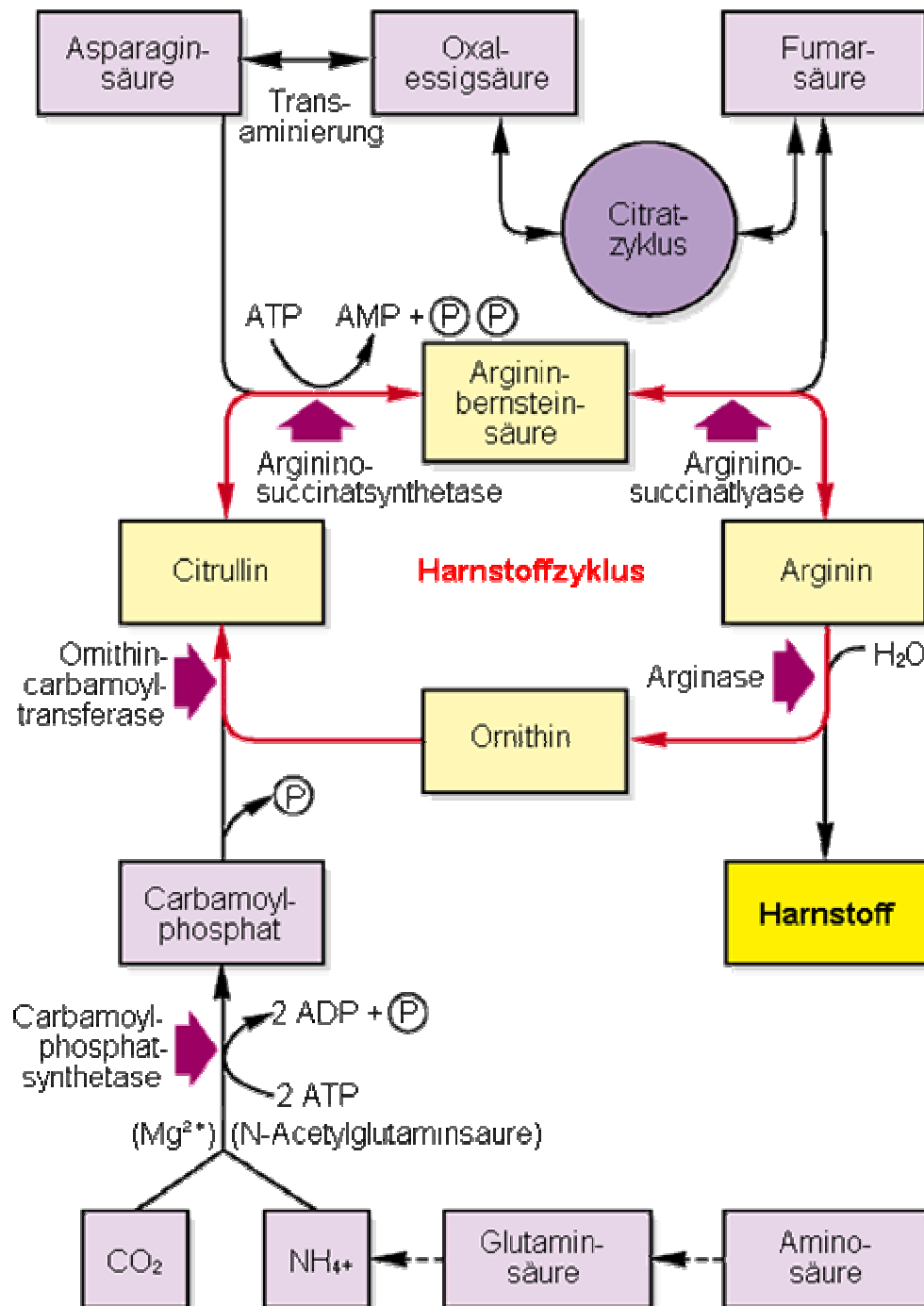


Abbildung 5: Schema des Harnstoffzyklus (Roche Lexikon Medizin, 4. Auflage; Urban & Fischer Verlag, München (1999) (aus: <http://www.gesundheit.de/roche/ro15000/r15298.html>))

Eine Verminderung der Harnstoffausscheidung wird bei Leber- und Nierenerkrankungen beobachtet (MORGAN et al., 1977; KOLB, 1980). Eine Korrelation von Serumharnstoffwert und Glomerulumfiltrat ist nur zu ziehen, wenn keine extrarenalen Faktoren den Wert beeinflussen. So kann bei Vorliegen eines chronischen Nierenversagens mit Polyurie sowie bei Durchfällen, Erbrechen und Leberinsuffizienz der Serumharnstoffwert weniger erhöht sein als erwartet. Demgegenüber ist ein stärker erhöhter Serumharnstoffwert zu erwarten, wenn bei chronischem Nierenversagen zusätzlich Oligurie, exzessive Eiweißzufuhr, Herzinsuffizienz oder Magen-Darm-Blutungen auftreten (THOMAS, 2000).

Ein Anstieg der Harnstoffkonzentration im Serum bedeutet in der Regel eine schwere Einschränkung der Nierenfunktion. Bei einer renal bedingten Harnstoffhöhung sind mehr als zwei Drittel der Nephrone geschädigt (KRAFT und DÜRR, 1981; GASCHEN, 2002). Folgende Erkrankungen führen zu einer Erhöhung des Serumsharnstoffs:

1. Prärenale Niereninsuffizienz: Sie wird nach schweren Blutungen, Erbrechen, Diarrhöen, Verbrennungen und mangelnder Flüssigkeitszufuhr beobachtet. Ursache des Harnstoffanstiegs ist eine verminderte Perfusion der Nieren und eine verstärkte tubuläre Rückdiffusion von Harnstoff, die durch die Hypovolämie bedingt ist.
2. Akute und chronische renale Niereninsuffizienz: Wie für Kreatinin besteht auch für Harnstoff eine inverse Beziehung zwischen der Höhe des Serumwertes und der glomerulären Filtrationsrate (GFR).
3. Postrenale Niereninsuffizienz: Dem postrenalen Nierenversagen liegt eine Abflussbehinderung der ableitenden Harnwege zugrunde. Ursächlich handelt es sich meist um Prostataerkrankungen oder Obstruktionen durch Harnsteine oder Tumoren (CHEW und DIBARTOLA, 1994; SARRE et al., 1998).

Daneben kann der Serumharnstoff bei hoher Eiweißzufuhr ansteigen. Dies ist besonders der Fall, wenn zusätzlich mangelnde Flüssigkeitszufuhr, erhöhter Eiweißkatabolismus und/oder stärkeres Schwitzen vorliegen (THOMAS, 2000).

Bei Mäusen führen Amyloidose (CHAI, 1978), Immunkomplexkrankheiten (MARK et al., 1984) und polyzystische Nierenerkrankungen (UEYAMA et al., 1984) zu einer Störung der Glomerulumfunktion und damit zu einer Erhöhung der Harnstoffkonzentration im Blut. Knockout-Mäuse mit einer vollständigen Defizienz des Harnstofftransporterproteins B (UT-B) zeigen eine verminderte Harnstoffausscheidung im Urin bei gleichzeitiger Erhöhung der Harnstoffkonzentration im Blut (YANG et al., 2002).

2.8 Wichtige Symptome der Niereninsuffizienz

2.8.1 Azotämie

Die Azotämie bezeichnet eine erhöhte Blutkonzentration von harnpflichtigen, nichteiweißartigen Stickstoffverbindungen (z.B. Harnstoff, Kreatinin). Eine Azotämie entsteht als Folge eines verstärkten Eiweißabbaus oder einer herabgesetzten Nierenfunktion aufgrund von prärenalen, renalen oder postrenalen Veränderungen, welche eine verminderte Ausscheidung dieser stickstoffhaltigen Substanzen bedingt. Man unterscheidet folgende Azotämieformen:

1. Die Produktionsazotämie (metabolische, extrarenale Azotämie) ist eine meist vorübergehende Erhöhung von harnpflichtigen, nichteiweißartigen Stickstoffverbindungen, die durch verminderten Proteinaufbau oder durch erhöhten Proteinabbau verursacht ist.
2. Eine Retentionsazotämie entsteht infolge einer Niereninsuffizienz mit stark eingeschränkter Ausscheidung von harnpflichtigen nichteiweißartigen Stickstoffverbindungen (PSCHYREMBEL, 1998).

2.8.2 Urämie

Die Urämie ist ein klinisches Syndrom, das mit einem kritischen Verlust an funktionstüchtigen Nephronen einhergeht. Sie entsteht infolge der Anreicherung von zahlreichen harnpflichtigen Substanzen im Blut (GASCHEN, 2002). Die Auswirkungen dieser angesammelten Substanzen werden als urämisches Syndrom in verschiedenen Organsystemen sichtbar (Tab. 7).

Tabelle 7: Auswirkung des urämischen Syndroms auf verschiedene Organsysteme (GASCHEN, 2002)	
Organsystem	Auswirkung
Verdauungsapparat	Anorexie Erbrechen Geschwüre
Hämatopoietisches System	Anämie Störung der Hämostase (Thrombopathie)
Immunsystem	Immunschwäche
Herz und Kreislauf	Arterielle Hypertension evt. Myokarditis, Pericarditis
Respirationsapparat	Urämische Pneumonie
Bewegungsapparat	Renale Osteodystrophie Metastatische Verkalkung Wachstumsverzögerung Muskelschwäche
Nervensystem	Enzephalopathie Neuropathie
Endokrinum	Sekundärer renaler Hyperparathyreoidismus Erythropoetinmangel Hypergastrinämie
Energie- und Proteinstoffwechsel	Hyperglykämie Hypertriglyzeridämie Abmagerung
Wasser- und Elektrolyt- Haushalt, Säure-Basen-Haushalt	Hypernatriämie Hypokaliämie Hypokalzämie Hyperphosphatämie Metabolische Azidose

2.8.3 Anämie

Als Anämie wird eine Verminderung der Erythrozyten, der Hämoglobinkonzentration oder des Hämatokrits unter den alters- und geschlechtsspezifischen Referenzwert bezeichnet (REUTER, 2000). Folgende Anämieformen treten auf: Blutungsanämie, Anämien durch gestörte Hämoglobinsynthese, Anämien durch gestörte Erythrozytenbildung, Anämie durch beschleunigten Erythrozytenabbau und renale Anämie.

Unter renal Anämie versteht man einen Mangel an Erythrozyten, der im Verlauf einer chronischen Niereninsuffizienz entsteht. Hauptursache dieser Erkrankung ist der Mangel an Erythropoetin, das zum Großteil in der Niere gebildet wird und die Bildung der roten Blutkörperchen im Knochenmark anregt. Eine weitere Ursache der Anämie ist, dass die Lebensdauer der roten Blutkörperchen unter Einwirkung der harnpflichtigen Substanzen verkürzt ist (SELMA, 1999; TOEPFER, 2001).

3 MATERIAL UND METHODEN

3.1 Versuchstiere

Die für die vorliegende Arbeit verwendeten Tiere stammten aus dem Münchener ENU-Maus-Mutagenese-Projekt. Im Rahmen dieses Forschungsvorhabens wurde eine dominante Mutation in der Mauslinie HST001 etabliert. Die Erzeugung der Mauslinie HST001 durch ENU-induzierte Mutagenese erfolgte im Rahmen eines von der zuständigen Behörde (Regierung von Oberbayern) genehmigten Tierversuchs. Die Behandlung der männlichen Tiere mit ENU sowie die Blutentnahmen von deren direkten Nachkommen sind darin enthalten. Die Genehmigung für die Zucht von mutanten Mäusen wurde von der zuständigen Behörde (Regierung von Oberbayern) für die Mäusehaltung des Institutes für Molekulare Tierzucht und Biotechnologie am Moorversuchsgut Badersfeld in Oberschleißheim erteilt. Standardisierte diagnostische Methoden zur Identifizierung der mutanten Nachkommen bereits etablierter Linien sowie die Tötung von Tieren zur Gewinnung von Gewebeproben sind nicht genehmigungspflichtig. Die Anzahl der verwendeten Tiere wurde im Rahmen der regelmäßigen Versuchstiermeldungen der zuständigen Behörde mitgeteilt.

Die Erhaltungszucht der mutanten Mauslinie HST001 erfolgte auf dem genetischen Hintergrund des Mausinzuchtstammes C3Heb/FeJ (C3H). Für die Untersuchung von klinisch-chemischen und hämatologischen Parametern wurden jeweils 20 männliche und weibliche heterozygot mutante Mäuse sowie als Kontrollen jeweils 20 männliche und weibliche Wildtypwurfgeschwister im Alter von 12, 18 und 24 Wochen untersucht. Je 5 männliche und weibliche heterozygote Mäuse sowie als Kontrollen je 5 männliche und weibliche Wildtypwurfgeschwister im Alter von 8 Monaten wurden für die Untersuchung der Nasen-Rumpf-Länge (NRL) und der Organgewichte herangezogen.

Die Erzeugung der Mäuse für die Kartierung der Mutation im Genom wurde wie folgt durchgeführt: Heterozygote mutante Mäuse aus der Erhaltungszucht (genetischer Hintergrund: C3Heb/FeJ) wurden mit C57BL/6/Jco-Mäusen (B6) angepaart (Outcross). Die Nachkommen wurden im Alter von 12 Wochen auf die Harnstoffkonzentration im Blut untersucht, um die Mutationsträger zu identifizieren. Tiere, die einen erhöhten Harnstoffwert zeigten, wurden zur Absicherung des Ergebnisses nach 3-4 Wochen ein zweites Mal untersucht. F1-Hybriden, die zweimal einen pathologisch erhöhten Harnstoffspiegel aufwiesen, wurden wiederum mit B6-Mäusen verpaart (Backcross). Die Nachkommen aus

diesen Verpaarungen wurden mindestens zweimal auf ihren Harnstoffspiegel im Blut untersucht, um die Mutationsträger zu identifizieren. Da B6-Mäuse im Mittel einen höheren Harnstoffspiegel im Plasma aufweisen als C3H-Tiere (eigene unveröffentlichte Daten), war die Zuordnung der Tiere zu den Gruppen „Mutanten“ und „Wildtypiere“ erschwert. Für die weitere Analyse wurden nur die Mäuse verwendet, welche aufgrund der Harnstoffkonzentration mit großer Sicherheit einer der beiden Gruppen zugeordnet werden konnten. Diese wurden durch zervikale Dislokation schmerzlos getötet. Danach erfolgte die Entnahme einer Schwanzprobe und der Milz, welche sofort anschließend in einem Probengefäß (Fa. Eppendorf) in flüssigem Stickstoff schockgefroren wurde. Die Schwanzproben, sowie auch die Milzproben, lagerten bei -80°C bis zur weiteren Analyse.

Alle Mäuse wurden unter identischen Bedingungen gehalten. Ihre Unterbringung erfolgte in Makrolonkäfigen des Typs II, in Gruppengrößen von 1-5 Tieren, auf Labortiereinstreu (3/4 Faser, Fa. Sniff) mit daraufliegendem Gitterrost unter gleichbleibenden klimatischen Bedingungen (20-23°C Raumtemperatur, 50-60% relative Luftfeuchtigkeit, Lichtprogramm mit 12 Stunden dauernder Tagphase). Pelletiertes Alleinfuttermittel für Mäuse (Fa. Altromin) sowie Wasser standen den Tieren ad libitum zur Verfügung. Die Nachkommen wurden im Alter von 3-4 Wochen abgesetzt, durch Ohrlochung markiert und nach Geschlechtern getrennt gehalten.

3.2 Phänotypische Untersuchung der Tiere

3.2.1 Phänotypische Gruppierung der Tiere

Nachkommen der Anpaarungen von heterozygot mutanten Tieren mit C3H-Wildtypmäusen wurden aufgrund ihres Phänotyps entweder den Mutationsträgern oder der Gruppe der Wildtypmäuse zugeteilt. Die Einteilung der Tiere erfolgte nach der Bestimmung der Harnstoffkonzentration im Blut in einem Alter von 12, 18 und 24 Wochen. Die Tiere, die mit zunehmendem Alter einen Anstieg der Harnstoffkonzentration im Blut aufwiesen und deren mittlere Harnstoffkonzentration aller drei Messungen im Blut über 80 mg/dl bei männlichen bzw. über 70 mg/dl bei weiblichen Tieren lag, wurden als Mutanten definiert. Die Tiere, die eine gleichbleibende oder abfallende Harnstoffkonzentration im Blut aufwiesen, und deren mittlere Harnstoffkonzentration aller drei Messungen unter 60 mg/dl für männliche Tiere

bzw. unter 50 mg/dl für weibliche Tiere lag, wurden als Wildtyptiere definiert. Alle Tiere mit C3H-Hintergrund ließen sich auf einer der beiden Gruppen zuordnen.

Bei Tieren mit Hybridhintergrund war die Zuordnung zu den Gruppen erschwert. Während F1-Hybriden eine ähnliche Harnstoffkonzentration im Plasma wie die C3H-Tiere aufwiesen, war die Varianz bei den Nachkommen aus dem Backcross stark erhöht. Als mutante Tiere wurden Mäuse definiert, die einen ansteigenden, stark erhöhten Harnstoffspiegel aufwiesen (männliche Tiere: ansteigend von > 85 mg/dl auf > 100 mg/dl; weibliche Tiere: ansteigend von > 80 mg/dl auf > 90 mg/dl). Als Wildtyptiere galten Mäuse, bei denen zweimal ein Harnstoffwert von < 60 mg/dl gemessen wurde.

3.2.2 Untersuchung der Körpergewichtsentwicklung, Körpermaße und Organgewichte

Die Körpergewichtsentwicklung wurde von der 4. bis zur 26. Lebenswoche durch ein Wiegeprogramm bestimmt. Alle Nachkommen aus der HST001 Erhaltungszucht wurden in der 4., 6. und 8. Lebenswoche und danach alle drei Wochen mit einer Präzisionswaage (Fa. Kern) auf 0.1 g genau gewogen. Zur Messung der Nasen-Rumpf-Länge (NRL) und zur Bestimmung der absoluten und relativen Organgewichte standen jeweils 5 männliche und weibliche mutante Mäuse sowie jeweils 5 männliche und weibliche Wildtypwurfgeschwister als Kontrollen zur Verfügung. Sie wurden im Alter von 8 Monaten nach Äthernarkose schmerzlos durch weitgehenden Blutentzug mittels Punktion des retrobulbären Venenplexus euthanasiert. Danach erfolgte die Messung der Nasen-Rumpf-Länge (NRL) in Bauchlage auf 1 mm genau. Anschließend wurden folgende Organe entnommen, mit Hilfe von Zellstoff von anhaftendem Blut befreit und auf einer Präzisionswaage (Fa. Kern) auf 0,1 mg genau gewogen: Herz, Lunge, Nieren, Milz, Pankreas, Speicheldrüsen, Thymus, Gehirn, Hoden bzw. Uterus, Leber, Magen-Darm-Trakt, Haut, intraabdominales Fett (Mesenteriumsfett, Nierenlagerfett und Fett um die Geschlechtsorgane) sowie der Rumpf ohne Kopf.

3.2.3 Bestimmung der Futteraufnahme

Je 10 männliche und weibliche Tiere der Gruppe „Mutanten“ sowie je 10 männliche und weibliche Wildtypwurfgeschwister im Alter von 26 Wochen standen hierfür zur Verfügung. Ziel dieser Untersuchung war es, die Futteraufnahme pro Tag bei den Mäusen beider Gruppen (Mutanten/Wildtyp) zu vergleichen. Jede Maus wurde allein in einem Käfig gehalten und bekam 100 g Futter zugeteilt. Nach 3 Tagen wurde das Restfutter gewogen und die Bestimmung der Futteraufnahme pro Tag erfolgte wie folgt: $(\text{Futtermasse} - \text{Restfutter}) : 3$. Die Ermittlung des Futtergewichts erfolgte mit einer Präzisionswaage (Fa. Kern) auf 0,1 g genau.

3.2.4 Histologische Untersuchung

Diese Untersuchungen wurden in Zusammenarbeit mit dem Institut für Tierpathologie der Veterinärmedizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München (Prof. Dr. R. Wanke) durchgeführt. Von je 4 männlichen und weiblichen mutanten Tieren sowie von je 4 männlichen und weiblichen Wildtyptieren im Alter von 8 Monaten wurden folgende Organe untersucht: Niere, Leber, Milz und Pankreas.

Die Organe wurden für 24 Stunden in 10% neutralgepufferter Formalinlösung fixiert. Die Einbettung der Gewebe in Paraffin erfolgte routinemäßig in einem Histomaster 2050/DI (Fa. Bavimed). Mit Hilfe eines HM 315 Microtoms (Fa. Microm) wurden 3-4 µm dicke Paraffinschnitte hergestellt und auf Glasobjektträger aufgezogen. Zur Färbung der Schnitte dienten verschiedene Methoden: Hämatoxylin-Eosin-F (HE), Perjodsäure-F Schiff-Reaktion nach McManus (PAS), Trichromfärbung nach Masson, Giemsa.

3.2.5 Blutentnahme und Plasmagewinnung

Für die klinisch-chemischen und hämatologischen Untersuchungen wurde den Mäusen im Alter von 12, 18 und 24 Wochen, nach vorherigem 12-18 stündigem Futterentzug, unter Äthernarkose (Diethyläther, Fa. Roth) Blut entnommen. Mit Hilfe einer heparinisierten Glaskapillare (\varnothing 0.8 mm, Fa. K& K) wurde der retroorbitale Venenplexus punktiert. Jeweils 300 μ l Blut wurden in einem mit Lithium-Heparin beschichteten Probengefäß (Fa. KABE) gesammelt und zentrifugiert (7000 rpm, 5 min). Das abpipettierte Plasma (je 130 μ l) wurde bei -20°C bis zur Untersuchung maximal eine Woche gelagert. Weitere 50 μ l Blut wurden in einem EDTA beschichteten Probengefäß (Fa. KABE) aufgefangen und für die Bestimmung der Blutbildparameter verwendet.

3.2.6 Bestimmung der klinisch-chemischen Parameter im Plasma und im Urin

Die Messung der klinisch-chemischen Parameter erfolgte in Zusammenarbeit mit dem Institut für klinische Chemie des Städtischen Krankenhauses München-Harlaching und ab Januar 2002 in Zusammenarbeit mit dem klinisch-chemischen Labor der „German Mouse Clinic“ in der GSF.

Zur Erfassung der Nierenfunktion wurden die Harnstoff- und Kreatininkonzentrationen im Blut und der Harnstoffwert im Urin der Mäuse gemessen. Zur Beurteilung von Leberstatus und Leberfunktion wurden folgende Parameter untersucht: Aspartat-Amino-Transferase (AST), Alanin-Amino-Transferase (ALT), Alkalische Phosphatase (AP). Weitere Untersuchungsparameter im Serum waren Glukose (GLS), Gesamtprotein (GP), Triglyceride (TG), Cholesterin (CHO), Harnsäure (HS), Kreatinkinase (CK), Amylase (AMY) sowie die Elektrolyte Kalium (K), Natrium (Na), Kalzium (Ca), Chlorid (Cl) und Phosphat (P). Die Bestimmung der Elektrolytkonzentrationen erfolgte photometrisch (Eppendorf AFM 5051). Die übrigen Parameter wurden mit einem automatischen Analysegerät (Hitachi System 717, ab 2002 Olympus AU400) unter Verwendung der von Fa. Boehringer bzw. Olympus hergestellten, adaptierten Reagenzien untersucht.

Zur Bestimmung der Aktivitäten von AST, ALT, AP und CK im Serum dienten die jeweiligen optimierten Standardmethoden der Deutschen Gesellschaft für klinische Chemie. Die Messungen wurden unter Verwendung folgender Methoden durchgeführt: Jaffe-Methode (Kreatinin), kinetischer UV-Test (Harnstoff), enzymatische Farbttests (Harnsäure, Triglyceride), Gluco-quant Hexokinase-Methode (Glukose), Biuret-Methode (Gesamtprotein), CHOD-PAP-Methode (Cholesterin).

3.2.7 Bestimmung der Blutbildparameter

Die Blutbildparameter der Mäuse wurden im Alter von 12, 18 und 24 Wochen mit Hilfe eines automatischen Blutanalysegerätes (ABC-Animal-Blood-Counter, Fa. Scil) untersucht. Folgende hämatologische Parameter wurden gemessen: Anzahl der Leukozyten (WBK), Anzahl der Erythrozyten (RBK), Hämoglobinkonzentration (Hb), mittleres korpuskuläres Hämoglobin (MCH), mittlere korpuskuläre Hämoglobinkonzentration (MCHC), mittleres Zellvolumen (MCV), Hämatokrit (HKT) und die Anzahl der Thrombozyten (PLT).

3.2.8 SDS-PAGE (Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese)

Zur Analyse der Proteinzusammensetzung im Harn wurde die Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) verwendet. Diese Untersuchungsmethode ermöglicht nach Denaturierung der Proteine mittels Natriumdodecylsulfat (SDS) deren gelelektrophoretische Auftrennung entsprechend ihrer Molekularmasse. Von jeder Maus wurden 20 µl Harn gewonnen, mit der gleichen Menge Probenpuffer (siehe Anhang) versetzt und für 10 Minuten auf 100°C im Thermoblock erhitzt, um die Proteine zu denaturieren. Für diese Untersuchung wurden gebrauchsfertige Gele (Ready Gels: 4-25%, Tris-HCl, 15 wells, 15 µl) der Firma Bio-Rad Laboratories (USA) verwendet. In die erste Vertiefung des Gels wurden 6 µl Proteinlängenstandard Broad Range (Art. Nr. 161-0318, Bio-Rad Laboratories) und in die übrigen Vertiefungen je 10 µl der Proben aufgetragen. Die Elektrophorese wurde bei 200 Volt 45 Minuten durchgeführt. Danach wurden die Gele mit Coomassie-Reagenz 30 Minuten gefärbt und anschließend in Ethanol-Eisessig-Lösung entfärbt. Die Gele wurden zur Dokumentation fotografiert und anschließend getrocknet.

3.3 Genomanalyse der Tiere

Die Kartierung der Mutation im Genom erfolgte in Zusammenarbeit mit der Abteilung für Veterinäranalytik und Genotypisierung der Fa. Medigenomix GmbH, Plannegg/Martinsried. Genomische DNA von Mäusen wurde gepoolt. Insgesamt wurden drei Pools mit DNA von mutanten Tieren (8 – 20 Tiere pro Pool) und zwei Pools mit DNA von Wildtyp-Tieren (8 und 24 Tiere pro Pool) hergestellt. Im Anschluß erfolgt eine PCR mit polymorphen Mikrosatellitenmarkern, welche nach den Angaben der Mouse Genome Informatics (MGI)-Datenbank der Jackson Laboratories (<http://www.informatics.jax.org>) ausgewählt wurden. Eine Tabelle mit den verwendeten Markern befindet sich im Anhang.

Die Vorwärtsprimer wurden zur automatischen Fragmentlängenanalyse mittels Kapillargelelektrophorese mit den Farbstoffen FAM, TET und HEX markiert. In der PCR wurden jeweils ca. 30 ng/2µl der gepoolten DNAs in den folgenden PCR Ansatz eingesetzt:

H ₂ O	12,13 µl
MgCl ₂ (25 mmol)	2,8 µl
PCR Puffer 10 x (AB)	2,36 µl
dNTP 10 mmol	0,44 µl
Taq (5 U/µl)	0,18 µl
Primer 1+2 (10 pmol)	0,09 µl
Genomische DNA	2,0 µl

Die Amplifikation der einzelnen Marker erfolgte unter den folgenden Bedingungen:

94°C 10 min

94°C 30 s
55°C 30 s 28 Zyklen
72°C 30 s

94°C 30 s
55°C 30 s 2 Zyklen
72°C 10 min

4°C

Im Anschluß wurden die PCR-Produkte gepoolt und auf einem Kapillarsequenzier (ABI 3100) aufgetrennt. In jedem Pool wurde ein Größenstandard (TAMRA 500, AB) mitgeführt. Die Fragmentlänge wurde mit den Programmen Gene Scan und Geno Typer (AB) bestimmt. Für jeden Marker wurde zur Kontrolle DNA von je einer C57BL/6- und C3H-Maus mitanalysiert die der Zuordnung der PCR-Amplifikate zu den Allelen der beiden Mauslinien dienten. Die Peakhöhen der für C57BL/6 und C3H spezifischen Amplifikate der beiden DNA Pools (Mutanten und Wildtypiere) wurden miteinander verglichen. Ein gegenüber dem Wildtypypool erhöhtes Verhältnis der Peakhöhen von C3H- und C57BL/6-Allel bei dem Mutantenpool wies auf eine genetische Kopplung des entsprechenden Mikrosatellitenmarkers und der Mutation hin. Zeigten mehrere Marker eines Chromosoms diese genetische Kopplung mit der Mutation, wurde die Genmutation auf dem entsprechenden Chromosom kartiert. Nach Identifizierung des entsprechenden Chromosoms als Lokalisationsort der Mutation wurden die einzelnen genomischen DNAs der Mutanten und Wildtypiere mit allen zur Verfügung stehenden Markern auf diesem Chromosom getestet, um die Lage der Mutation einzugrenzen.

3.4 Statistische Auswertung

Die statistischen Tests wurden mit Hilfe des Statistikprogramms SPSS für Windows 11.0 durchgeführt. Die Darstellung der Abbildungen in dieser Arbeit erfolgte mit Hilfe des Programms Prism 3.0.

Für die Körpergewichtsentwicklung wurde für jeden Messzeitpunkt der Mittelwert der Körpergewichte der beiden Gruppen getrennt nach Geschlechtern berechnet. Die Unterschiede der Körpergewichtsmittelwerte beider Gruppen wurden mit dem t-Test auf Signifikanz geprüft. Mittels Varianzanalyse wurden die Einflüsse von Geschlecht und Gruppe sowie von Gruppe x Geschlecht auf die Nasen-Rumpf-Länge und auf die absoluten und relativen Organgewichte geprüft. Die Differenzen der Mittelwerte der Nasen-Rumpf-Länge (NRL), der Haut-, Fett- und Rumpfgewichte sowie der Organgewichte der Tiere beider Gruppen wurden mit dem t-Test auf Signifikanz geprüft. Mittels Varianzanalyse wurden die Einflüsse von Geschlecht, Gruppe, Gruppe x Geschlecht und Alter auf die klinisch-chemischen Parameter sowie auf die Blutbildparameter geprüft. Die Differenzen der klinisch-chemischen Parameter und Blutbildparameter der Tiere beider Gruppen wurden mit dem t-Test auf Signifikanz geprüft.

4 ERGEBNISSE

4.1 Penetranz des Merkmals und Einfluss des genetischen Hintergrundes

Im Rahmen des Münchener ENU-Maus-Mutagenese-Projekts wurde innerhalb der klinisch-chemischen und hämatologischen Untersuchung die dominante Mutation der Linie HST001 auf dem genetischen Hintergrund des C3H-Inzuchtstammes etabliert. Ein F1-Nachkomme eines ENU-mutagenisierten Tieres zeigte eine Veränderung, die sich phänotypisch durch einen Anstieg der Harnstoffkonzentration im Blut äußerte. Nach dem Nachweis der Vererblichkeit dieses pathologischen Phänotyps wurde die Erhaltungszucht HST001, durch Anpaarung heterozygoter Merkmalsträger mit C3H-Wildtyptieren, etabliert. Die phänotypische Einteilung der Nachkommen aus der Erhaltungszucht erfolgte anhand der Harnstoffkonzentration im Blut im Alter von 12, 18 und 24 Wochen. Tiere, die mit zunehmendem Alter einen Anstieg der Harnstoffkonzentration im Blut aufwiesen und deren mittlere Harnstoffkonzentration aller drei Messungen im Blut über 80 mg/dl bei männlichen bzw. über 70 mg/dl bei weiblichen Tieren lag, wurden als Mutanten definiert. Die Tiere, die eine gleichbleibende oder abfallende Harnstoffkonzentration im Blut aufwiesen, und deren mittlere Harnstoffkonzentration aller drei Messungen unter 60 mg/dl für männliche Tiere bzw. unter 50 mg/dl für weibliche Tiere lag, wurden als Wildtypiere definiert.

Nach Anpaarung von heterozygoten C3H-Mutanten mit C3H-Wildtypmäusen wurden insgesamt 184 Nachkommen (104 männliche, 80 weibliche) aus 30 Würfen auf diesen Phänotyp hin untersucht. Nach den Mendelschen Gesetzen der Vererbung wurde eine Verteilung von heterozygoten Mutanten und Wildtypieren im Verhältnis 1:1 erwartet. Die Nachkommen wurden phänotypisch in 88 mutante Tiere (49 männliche, 39 weibliche) und 96 Wildtypiere (55 männliche, 41 weibliche) eingeteilt. Die ermittelte Verteilung zeigte somit die vollständige phänotypische Penetranz der dominanten Mutation auf dem genetischen Hintergrund des C3H-Inzuchtstammes (Test nach DIXON und MOOD (SACHS, 2002)).

Nach Anpaarung von heterozygoten C3H-Mutanten mit C57BL/6-Mäusen wurden 30 Nachkommen (16 männlich, 14 weiblich) aus 5 Würfen auf die Harnstoffkonzentration im Blut untersucht. Die Nachkommen wurden phänotypisch in 14 mutante (8 männlich, 6 weiblich) und 16 Wildtypiere (8 männlich, 8 weiblich) eingeteilt, was auf eine vollständige Penetranz des Phänotyps hindeutet. Für die Rückkreuzung auf den Stamm C57BL/6 wurden

jedoch nur männliche mutante Mäuse verwendet, die bei der zweiten Untersuchung eine Harnstoffkonzentration über 100 mg/dl im Plasma aufwiesen.

Die Einteilung der Tiere der Rückkreuzungsgeneration (N2) in eine der beiden Gruppen „Mutante“ und „Wildtypiere“ wurde durch die Tatsache erschwert, dass der C57BL/6-Stamm einen deutlich höheren Harnstoffspiegel im Plasma aufwies als C3H-Wildtypiere. Auch hier erfolgte die Einteilung aufgrund einer mindestens zweimaligen Messung des Blutharnstoffspiegels. Als mutante Tiere wurden die Mäuse definiert, die einen ansteigenden, stark erhöhten Harnstoffspiegel aufwiesen (männliche Tiere: ansteigend von > 70 mg/dl auf > 90 mg/dl; weibliche Tiere: ansteigend von > 70 mg/dl auf > 80 mg/dl). Als Wildtypiere wurden Mäuse bewertet, die zweimal einen Harnstoffspiegel unter 60 mg/dl aufwiesen. Von insgesamt 255 N2-Tieren (118 männliche, 137 weibliche) konnten 41 Mäuse (26 männliche, 15 weibliche) der Gruppe der Mutanten zugeordnet werden. Insgesamt 58 Tiere (21 männliche, 37 weibliche) wurden als Wildtypen eingestuft. Für 31 Tiere (16 männliche, 15 weibliche) konnte kein zweiter Wert bestimmt werden, weil sie während oder nach der ersten Blutentnahme verstarben. Die restlichen 125 Tiere (55 männliche, 70 weibliche) wurden keiner der beiden Gruppen zugeordnet und deshalb für die genetische Analyse nicht herangezogen. Die Ergebnisse zeigen, dass eine eindeutige Phänotypbestimmung in der Rückkreuzungsgeneration bei ca. 50% der Tiere nicht möglich war. Wildtypiere waren einfacher zu identifizieren als mutante Mäuse.

4.2 Wachstumsparameter

4.2.1 Körpergewichtsentwicklung

Zur Untersuchung der Körpergewichtsentwicklung standen je 35 männliche und weibliche mutante Mäuse sowie je 35 männliche und weibliche Wildtypwurfgeschwister von der 4. bis zur 26. Lebenswoche zur Verfügung. Die durchschnittlichen Körpergewichte wurden getrennt für männliche und weibliche Tiere in der 4., 6. und 8. Lebenswoche und danach alle drei Wochen ermittelt und in einer Wachstumskurve aufgetragen.

Im Alter von 4 Wochen zeigte der Mittelwert des Körpergewichts keinen Unterschied zwischen mutanten Tieren und Wildtypwurfgeschwistern. Die Körpergewichtszunahme war bei den mutanten Tieren im gesamten Beobachtungszeitraum geringer als bei den

Wildtypwurfgeschwistern. Von der 6. Lebenswoche an war das mittlere Körpergewicht der mutanten Nachkommen (männlich und weiblich) für alle Messzeitpunkte signifikant niedriger als das der Wildtypwurfgeschwister. Im Alter von 26 Wochen waren die mutanten Tiere ca. 20% leichter als ihre Wildtypwurfgeschwister. Das Körpergewicht der männlichen Tiere beider Gruppen war signifikant ($p < 0,001$) höher als das der weiblichen Tiere (Tab. 8; Abb. 6A und 6B).

Tabelle 8: Mittelwert (\bar{x}) und Standardabweichung (s_x) des Körpergewichts (g) der Wildtypmäuse und der mutanten Mäuse						
Alter (Wochen)	Sex	n	Wildtyp		Mutante	
			\bar{x}	s_x	\bar{x}	s_x
4	m	35	18,6	2,4	17,9	2,5
	w	35	15,5	1,7	15,1	1,8
6	m	35	23,1	2,0	21,9	1,7
	w	35	20,3	1,7	18,9	1,5
8	m	35	27,3	2,4	24,6	2,0
	w	35	25,7	2,9	21,3	1,9
11	m	35	30,2	2,6	26	1,9
	w	35	26,8	2,8	23,8	1,6
14	m	35	32,8	3,6	27,7	1,9
	w	35	28,6	3,2	24,7	2,3
17	m	35	35,1	3,7	28,3	2,4
	w	35	29,9	3,6	25,3	1,9
20	m	35	36	4,9	29,1	2,3
	w	35	31,7	3,7	25,7	2,0
23	m	35	37,1	4,2	29,6	2,1
	w	35	32,7	3,7	26,2	2,1
26	m	35	38,2	4,2	30	2,7
	w	35	33,5	3,6	26,6	2,6

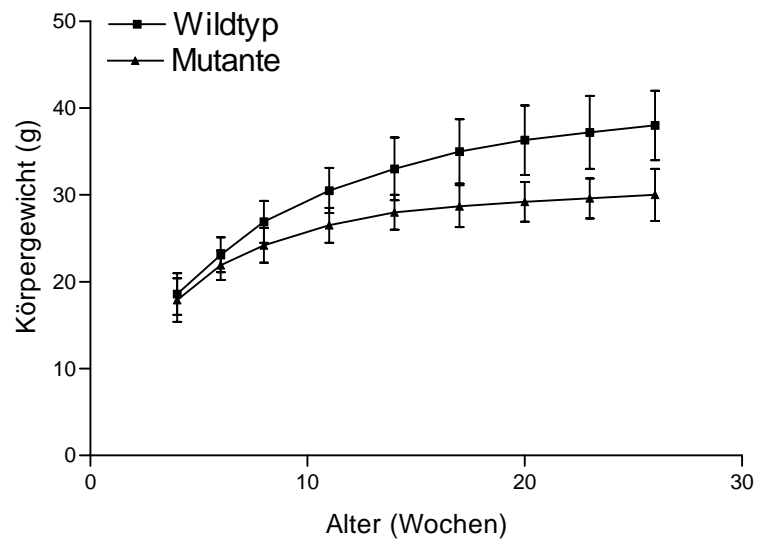
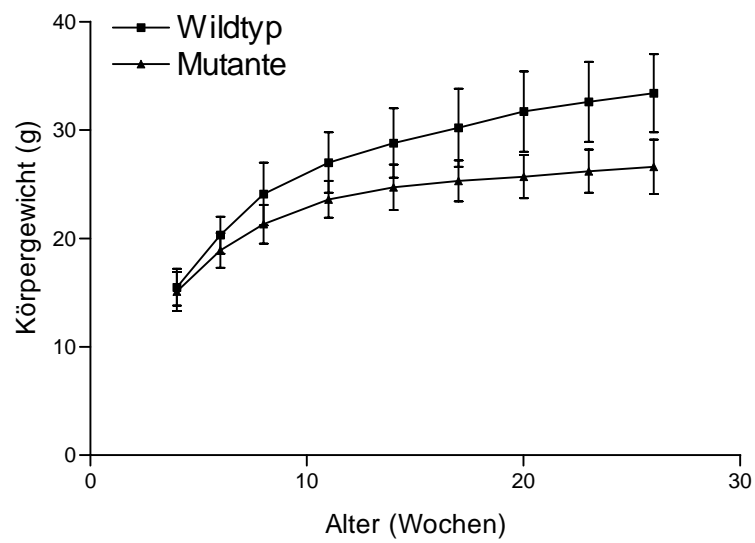
A**B**

Abbildung 6: Körpergewichtsentwicklung der männlichen (A) und weiblichen Mäuse (B) beider Gruppen.

4.2.2 Futteraufnahme

Die Ermittlung der aufgenommenen Futtermenge pro Tier und Tag wurde bei 26 Wochen alten Mäusen durchgeführt. Dabei wurden je 10 männliche und weibliche Mäuse der Gruppe „Mutanten“ sowie als Kontrollen je 10 männliche und weibliche Wildtypwurfgeschwister untersucht. Die Ergebnisse zeigen, dass sowohl die männlichen als auch die weiblichen mutanten Mäuse signifikant ($p < 0,001$) mehr Futter als ihre Wildtypwurfgeschwister aufnahmen (Tab. 9; Abb. 7).

Tabelle 9: Mittelwert (\bar{x}) und Standardabweichung (s_x) der täglichen Futteraufnahme (g/Tier) von Wildtypmäusen und mutanten Mäusen						
Sex	n	Wildtyp		Mutante		Vergleich der Gruppen
		\bar{x}	s_x	\bar{x}	s_x	
m	10	5,9 ^b	0,4	6,9 ^b	0,5	***
w	10	5,2	0,4	6,0	0,3	***
b: Vergleich der Futteraufnahme zwischen männlichen (m) und weiblichen (w) Mäusen innerhalb der gleichen Gruppe. t-Test: ^b $p < 0,01$; *** $p < 0,001$						

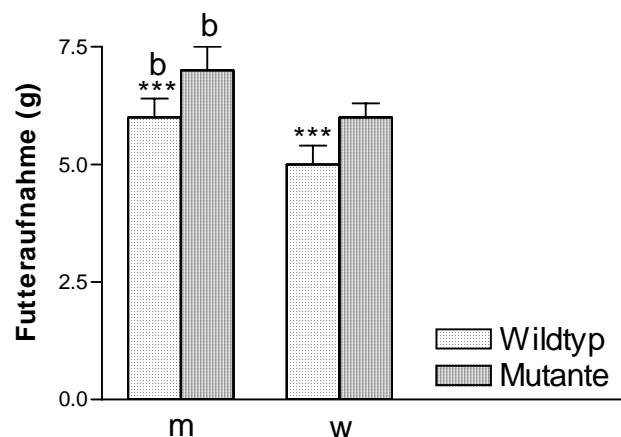


Abbildung 7: Vergleich der mittleren täglichen Futteraufnahme (g/Tier) der Mäuse beider Gruppen. Signifikante Unterschiede zwischen männlichen (m) und weiblichen (w) Mäusen innerhalb der gleichen Gruppe sind durch Buchstaben (b) und signifikante Unterschiede zwischen den beiden Gruppen innerhalb der Geschlechter sind durch * gekennzeichnet. t-Test: ^b $p < 0,01$; *** $p < 0,001$

4.2.3 Nasen-Rumpf-Länge (NRL)

Bei je 5 männlichen und weiblichen mutanten Mäusen sowie je 5 männlichen und weiblichen Wildtypkontrollen im Alter von 8 Monaten wurde die Nasen-Rumpf-Länge (NRL) untersucht. Die Varianzanalyse ergab, dass die Gruppe und das Geschlecht sowie die Interaktion zwischen Gruppe und Geschlecht einen signifikanten Einfluss auf die NRL der Mäuse beider Gruppen hatten. Die Messung der Nasen-Rumpf-Länge ergab, dass sowohl die männlichen als auch die weiblichen mutanten Tiere eine signifikant niedrigere NRL aufwiesen als die Wildtyptiere. Die männlichen Mäuse beider Gruppen hatten im Durchschnitt eine größere NRL als die weiblichen Tiere (Tab. 10 und 11; Abb. 8).

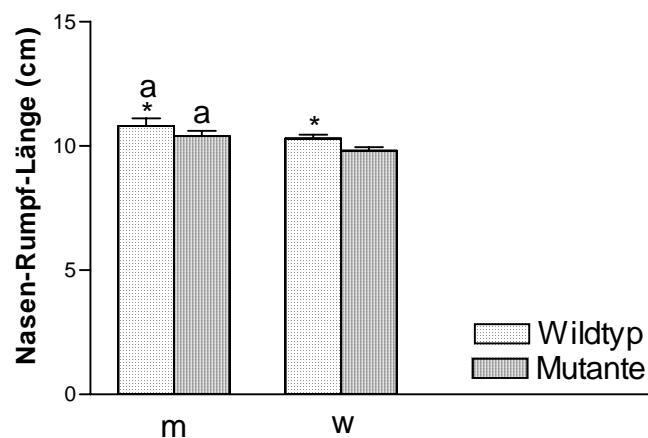


Abbildung 8: Vergleich der mittleren NRL der Tiere beider Gruppen. Signifikante Unterschiede zwischen männlichen (m) und weiblichen (w) Mäusen innerhalb der gleichen Gruppe sind durch Buchstaben (a) und signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen innerhalb der Geschlechter sind durch * gekennzeichnet. t-Test: ^a, * $p < 0,05$

4.2.4 Intraabdominales Fett, Haut und Rumpf

Im Alter von 8 Monaten wurden je 5 männliche und weibliche mutante Mäuse sowie je 5 männliche und weibliche Wildtypkontrollen auf die Parameter Fett-, Haut-, und Rumpfgewicht untersucht.

Hinsichtlich des absoluten Fett-, Haut-, und Rumpfgewichtes wurde festgestellt, dass die mutanten Mäuse für diese drei Parameter signifikant ($p < 0,001$ bei Fett-, $p < 0,01$ bei Haut- und Rumpfgewicht) niedrigere Werte als die Wildtypmäuse aufwiesen. Das Geschlecht hatte einen signifikanten Einfluss ($p < 0,01$) auf das absolute Haut- und Rumpfgewicht. Bei männlichen Tieren beider Gruppen waren die Werte für diese Parameter im Durchschnitt höher als bei den weiblichen Tieren.

Bezüglich des relativen Fett-, Haut- und Rumpfgewichtes wurde ermittelt, dass die mutanten Mäuse ein signifikant niedrigeres relatives Gewicht des intraabdominalen Fettgewebes als die Wildtypmäuse hatten. Die zwei übrigen Parameter zeigten zwischen den mutanten Mäusen und den Wildtypmäusen keine Unterschiede. Das Geschlecht übte nur auf das relative Hautgewicht einen Einfluss aus, männliche Tiere beider Gruppen wiesen hierbei einen höheren Wert als die weiblichen Tiere auf (Tab. 10 und 11; Abb. 9).

Parameter	Sex	Wert	Wildtyp		Mutante		Vergleich der Gruppen
			\bar{x}	s_x	\bar{x}	s_x	
NRL (cm)	m	abs.	10,8 ^a	0,3	10,5 ^a	0,1	*
	w	abs.	10,3	0,1	9,8	0,1	*
Haut (g)	m	abs.	7,1 ^b	0,2	5,4 ^b	0,5	**
		rel.	20,0 ^b	0,4	19,0 ^b	0,4	n.s.
	w	abs.	5,2	0,2	4,4	0,4	**
		rel.	17,0	0,3	17,0	0,4	n.s.
Intraabdominales Fett (mg)	m	abs.	1436	633	482	136	***
		rel.	4,0	0,1	2,0	0,1	**
	w	abs.	1413	577	357	121	***
		rel.	4,6	0,2	1,4	0,05	**
Rumpf (g)	m	abs.	14,2 ^b	0,5	12,2 ^b	0,2	**
		rel.	41,0	1,2	42,0	1,3	n.s.
	w	abs.	12,5	0,2	11,2	0,5	**
		rel.	42,0	1,3	43,0	1,1	n.s.

Signifikante Unterschiede zwischen männlichen (m) und weiblichen (w) Mäusen innerhalb der gleichen Gruppe sind durch die Buchstaben (a, b) und signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen innerhalb der Geschlechter sind durch * gekennzeichnet. t-Test: ^a, * p<0,05; ^b, ** p<0,01; *** p<0,001; n.s. = nicht signifikant

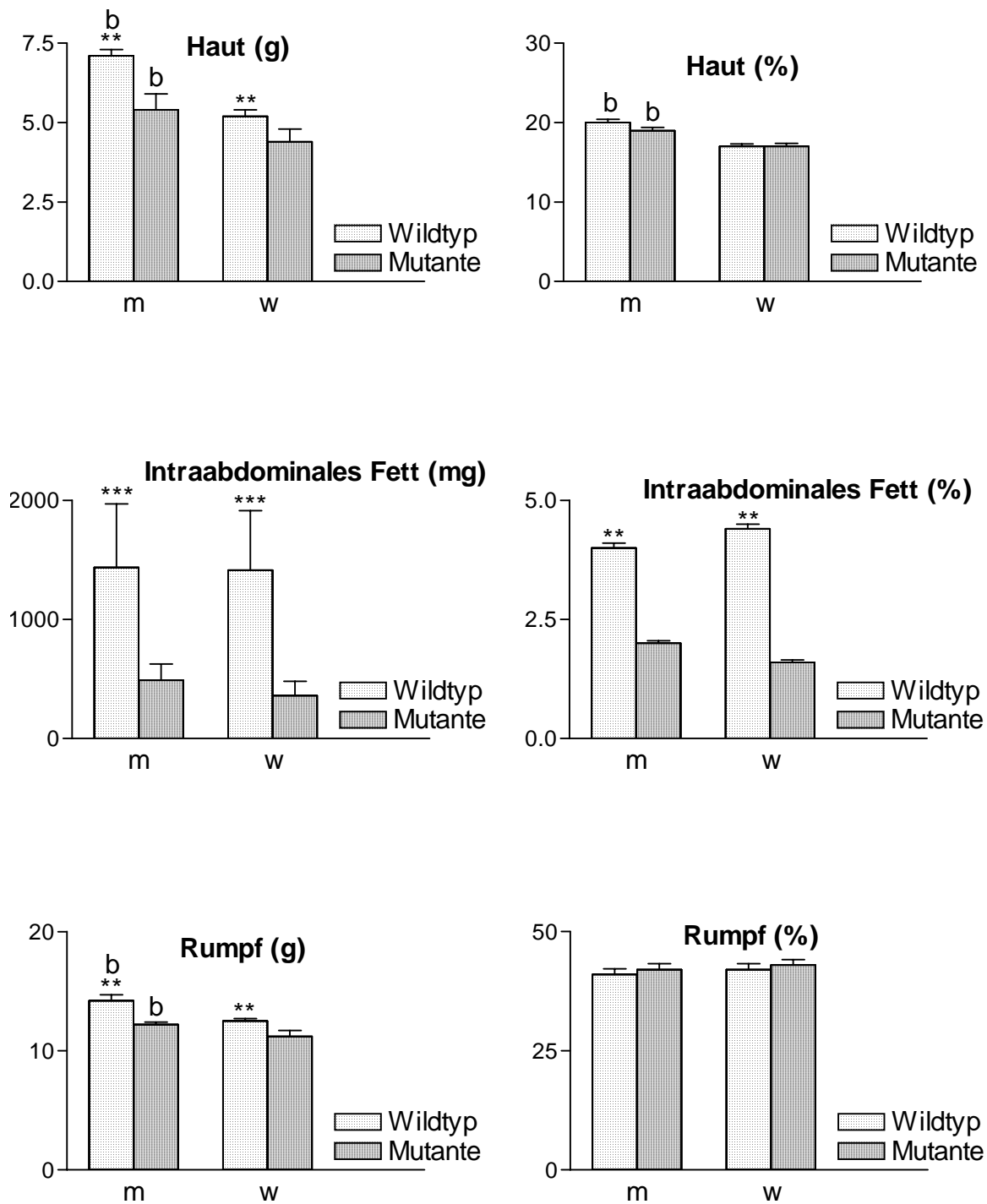


Abbildung 9: Vergleich des mittleren absoluten (links) und relativen (rechts) Gewichts des intraabdominalen Fettes, der Haut und des Rumpfes der Wildtypmäuse und der mutanten Mäuse. Signifikante Unterschiede zwischen männlichen (m) und weiblichen (f) Mäusen innerhalb der gleichen Gruppe sind durch Buchstaben (b) und signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen innerhalb der Geschlechter sind durch * gekennzeichnet. t-Test: ^b, ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$

4.2.5 Organgewichte

Der Vergleich der absoluten und relativen Organgewichte wurde bei Tieren im Alter von 8 Monaten durchgeführt. Je 5 männliche und weibliche Tiere der Gruppe „Mutanten“ sowie je 5 männliche und weibliche Tiere der Gruppe „Wildtypwurfgeschwister“ standen zur Verfügung. Die Messung der absoluten Organgewichte ergab, dass bei mutanten Tieren das Leber-, Lungen- und Herzgewicht signifikant ($p < 0,01$ bei Leber-, $p < 0,05$ bei Lungen- und Herzgewicht) niedriger war als bei den Wildtypmäusen. Dagegen war das Thymusgewicht der mutanten Tiere im Mittel signifikant ($p < 0,05$) schwerer als das der Wildtypwurfgeschwister. Bei den übrigen Organen wurde kein signifikanter Gewichtsunterschied zwischen den Tieren beider Gruppen nachgewiesen. Das Geschlecht hatte einen signifikanten ($p < 0,01$) Einfluss auf das Gewicht von Speicheldrüsen, Leber, Nieren und Milz. Bei männlichen Tieren beider Gruppen war das Gewicht der Speicheldrüsen, der Leber und der Nieren signifikant ($p < 0,01$ bei Speicheldrüsen und Leber, $p < 0,001$ bei Nieren) höher als bei den weiblichen Mäusen. Dagegen wiesen die weiblichen Mäuse ein signifikant ($p < 0,01$) höheres Milzgewicht als die männlichen Tiere auf (Tab. 12 und 13; Abb. 10a, 10b, und 10c).

Hinsichtlich der relativen Organgewichte wurde festgestellt, dass die mutanten Tiere signifikant ($p < 0,05$) höhere Werte bezüglich des relativen Milz- und Gehirngewichtes aufwiesen als die Wildtypwurfgeschwister. Das Geschlecht hatte einen signifikanten ($p < 0,01$) Effekt auf das relative Gewicht von Speicheldrüsen, Nieren, Gehirn und Milz. Die männlichen Mäuse wiesen signifikant ($p < 0,01$ bei Speicheldrüsen, $p < 0,05$ bei Nieren und Gehirn) höhere relative Werte des Speicheldrüsen-, Nieren- und Gehirngewichtes auf als die weiblichen Tiere. Dagegen hatten die weiblichen Tiere ein signifikant ($p < 0,01$) höheres relatives Milzgewicht als die männlichen Tiere (Tab. 14 und 15; Abb. 10a, 10b und 10c).

Tabelle 12:
Einfluss von Gruppe, Sex und Gruppe x Sex auf die absoluten Organgewichte
der Wildtypmäuse und der mutanten Mäuse

Organ	Gruppe	Sex	Gruppe x Sex
Speicheldrüsen	n.s.	**	n.s.
Milz	n.s.	**	n.s.
Leber	***	**	**
Herz	**	n.s.	n.s.
Lungen	**	n.s.	n.s.
Pankreas	n.s.	n.s.	n.s.
Nieren	n.s.	**	n.s.
Hoden	n.s.	-	-
Uterus	n.s.	-	-
Thymus	*	n.s.	n.s.
Magen-Darm-Trakt	n.s.	n.s.	n.s.
Gehirn	n.s.	n.s.	n.s.
Die Tabelle zeigt die Signifikanzen der durch die Varianzanalyse ermittelten F-Werte: *p< 0,05; ** p< 0,01; ***p< 0,001; n.s. = nicht signifikant			

Tabelle 14: Einfluss von Gruppe, Sex und Gruppe x Sex auf die relativen Organgewichte der Wildtypmäuse und der mutanten Mäuse			
Organ	Gruppe	Sex	Gruppe x Sex
Speicheldrüsen	n.s.	**	n.s.
Milz	**	**	**
Leber	n.s.	n.s.	n.s.
Herz	n.s.	n.s.	n.s.
Lungen	n.s.	n.s.	n.s.
Pankreas	n.s.	n.s.	n.s.
Nieren	n.s.	**	n.s.
Hoden	n.s.	-	-
Uterus	n.s.	-	-
Thymus	n.s.	n.s.	n.s.
Magen-Darm-Trakt	n.s.	n.s.	n.s.
Gehirn	**	**	n.s.
Die Tabelle zeigt die Signifikanzen der durch die Varianzanalyse ermittelten F-Werte: ** p< 0,01; n.s. = nicht signifikant			

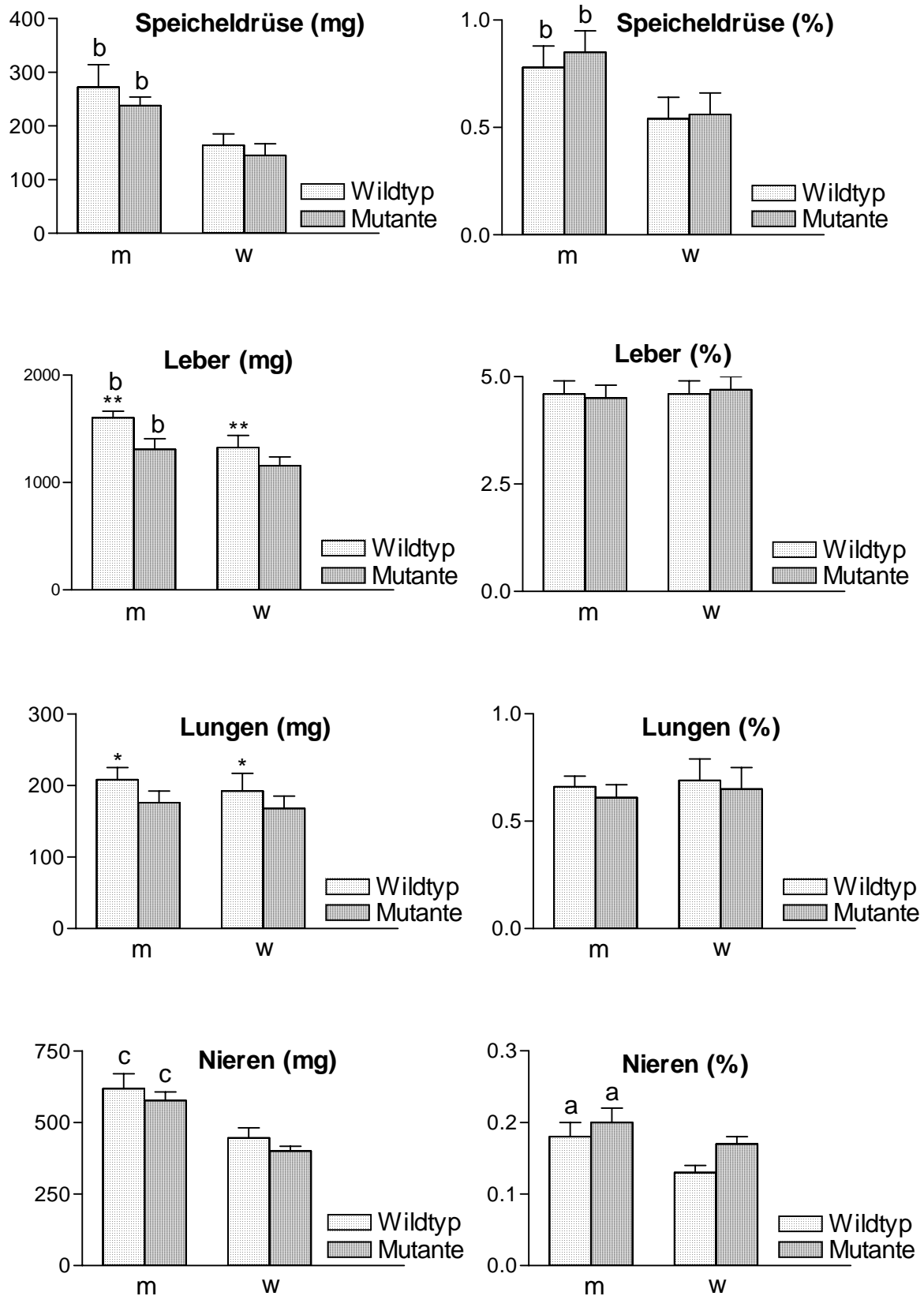


Abbildung 10a: Vergleich der mittleren absoluten (mg) und relativen (%) Organgewichte der Mäuse beider Gruppen. Signifikante Unterschiede zwischen männlichen (m) und weiblichen (w) Mäusen innerhalb der gleichen Gruppe sind durch die Buchstaben (a, b, c) und signifikante Unterschiede zwischen den beiden Gruppen innerhalb der Geschlechter sind durch * gekennzeichnet. t-Test: ^a * $p < 0,05$; ^b ** $p < 0,01$; ^c $p < 0,001$

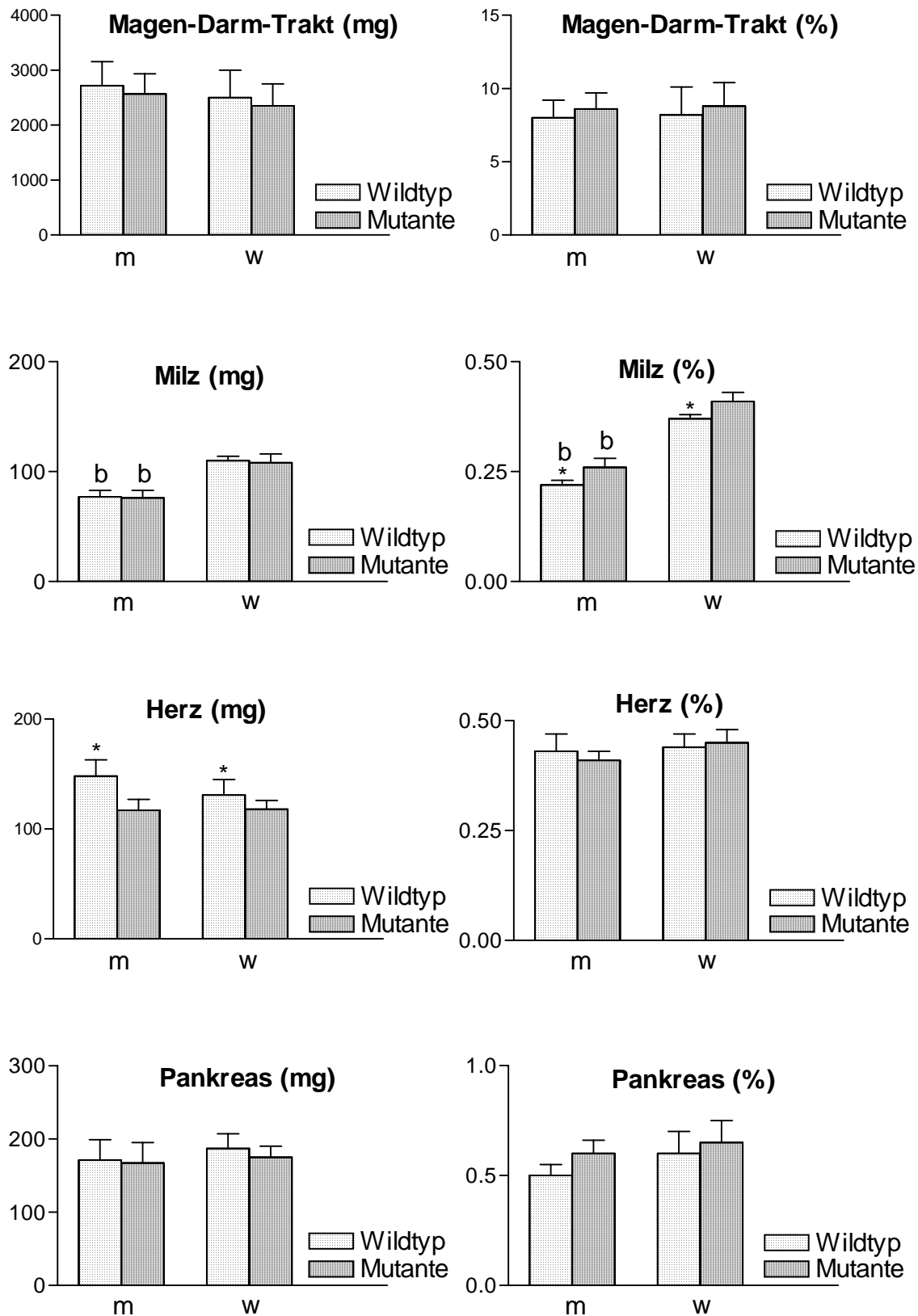


Abbildung 10b: Vergleich der mittleren absoluten (mg) und relativen (%) Organgewichte der Mäuse beider Gruppen. Signifikante Unterschiede zwischen männlichen (m) und weiblichen (w) Mäusen innerhalb der gleichen Gruppe sind durch Buchstaben (b) und signifikante Unterschiede zwischen den beiden Gruppen innerhalb der Geschlechter sind durch * gekennzeichnet. t-Test: * $p < 0,05$; ^b $p < 0,01$

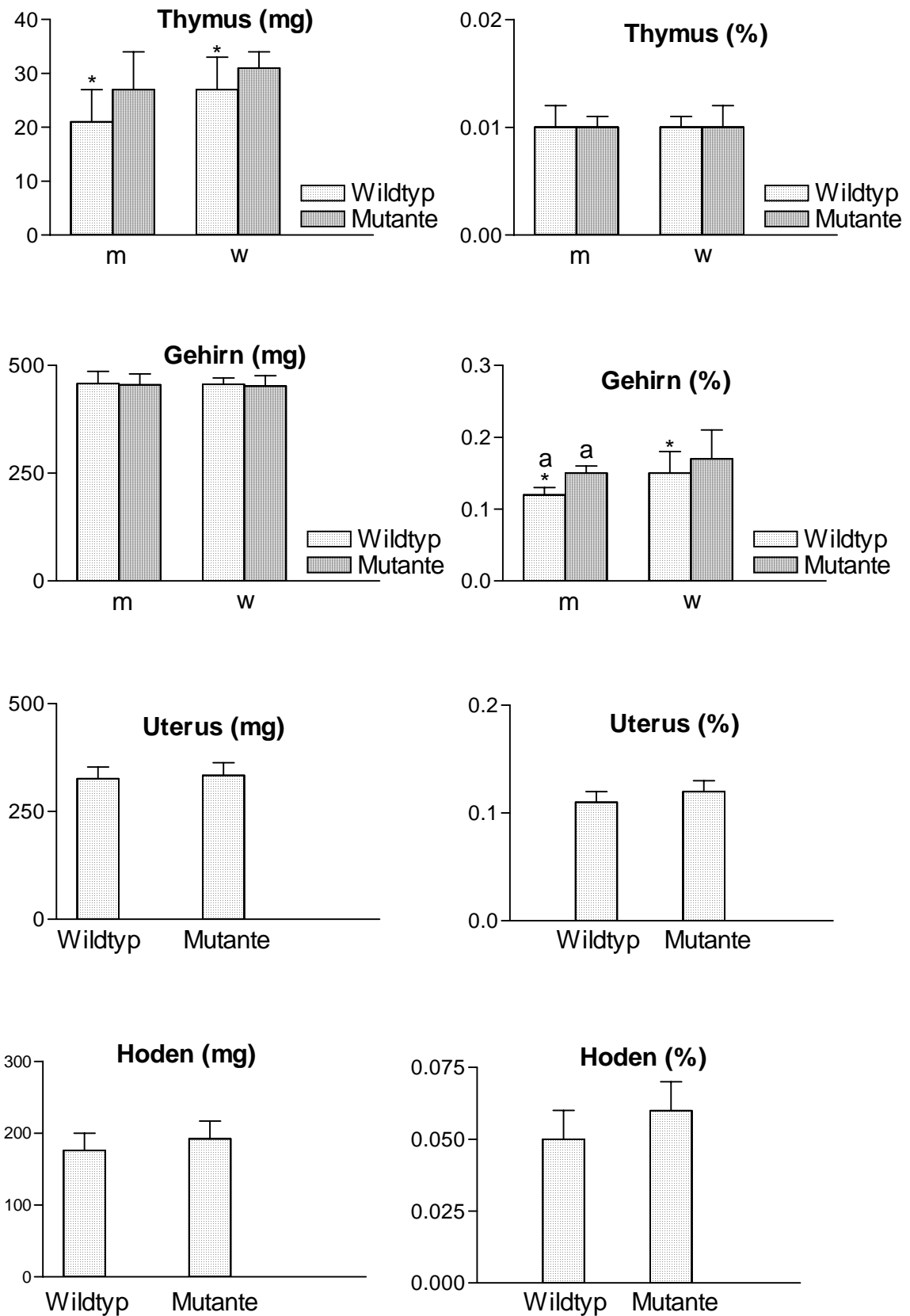


Abbildung 10c: Vergleich der mittleren absoluten (mg) und relativen (%) Organgewichte der Mäuse beider Gruppen. Signifikante Unterschiede zwischen männlichen (m) und weiblichen (w) Mäusen innerhalb der gleichen Gruppe sind durch Buchstaben (a) und signifikante Unterschiede zwischen den beiden Gruppen innerhalb der Geschlechter sind durch * gekennzeichnet. t-Test: ^a* p<0,05

4.3 Histologische Untersuchung der Organe

Zur weiteren Abklärung des pathologischen Phänotyps der Linie HST001 wurden die Organe von je 4 männlichen und weiblichen mutanten Tieren sowie von je 4 männlichen und weiblichen Tieren der Gruppe „Wildtyp“ als Kontrollen im Alter von 8 Monaten histologisch untersucht. Die Untersuchung wurde in Zusammenarbeit mit dem Institut für Tierpathologie der Veterinärmedizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München (Prof. Dr. R. Wanke) durchgeführt. Die histopathologischen Ergebnisse dieser Untersuchung sind in den Tabellen 16a und 16b dargestellt. Im Vergleich der Befunde der Tiere beider Gruppen ließ sich zusammenfassend die Ursache für die Erhöhung der Harnstoffkonzentration im Blut der Mutanten nicht erklären.

Tabelle 16a:
Histopathologische Befunde der Organe der mutanten Mäuse

Tier-Nr.	Sex	Phäno- typ	Organ	Histopathologische Befunde
20849	w	Mutante	Niere	Nichteitrige interstitielle Herdnephritis, herdförmige interstitielle Fibrose, nicht-eitrige Pyelitis
			Leber	Einzelne kleine lympho-plasmazelluläre Infiltrate mit Beteiligung von Granulozyten
			Milz	Follikuläre Hyperplasie, mgr. Hämosiderose
			Pankreas	Verdacht auf fokale Periinsulitis
20954	w	Mutante	Niere	Kleinherdige nicht-eitrige interstitielle Nephritis
			Leber	Herdförmige lympho- und histiozytäre Infiltrate, Vakuolierung der Leberzellen (typisch für Glycogeneinlagerung)
			Milz	Follikuläre Hyperplasie, Hämosiderose
21143	m	Mutante	Niere	Kleinherdige nicht-eitrige interstitielle Infiltration mit lymphozytärer und histiozytärer Beteiligung
			Leber	Vakuolierung der Leberzellen (typisch für Glycogeneinlagerung)
			Milz	Follikuläre Hyperplasie, Hämosiderose
21045	w	Mutante	Niere	Kleinherdige nicht-eitrige interstitielle Infiltration mit lymphozytärer und histiozytärer Beteiligung
			Leber	Vakuolierung der Leberzellen (typisch für Glycogeneinlagerung)
			Milz	Follikuläre Hyperplasie, Hämosiderose
31265	w	Mutante	Niere	Nicht-eitrige interstitielle Herdnephritis, fokale nicht-eitrige Pyelitis
			Leber	Hyperämie, vereinzelt perivaskuläre Rundzellinfiltrate
			Milz	Lymphatische Hyperplasie, monomorphes Zellbild
31433	m	Mutante	Niere	Herdförmige, nicht-eitrige interstitielle Nephritis, nichteitrige Pyelitis
			Leber	Hyperämie
			Milz	Lymphatische Hyperplasie, monomorphes Zellbild
31063	m	Mutante	Niere	Herdförmige nicht-eitrige interstitielle Nephritis
			Leber	Hyperämie
			Milz	Lymphatische Hyperplasie, monomorphes Zellbild
31535	m	Mutante	Niere	Chronisch nicht-eitrige interstitielle Herdnephritis
			Leber	Hyperämie
			Milz	Lymphatische Hyperplasie, monomorphes Zellbild

Tabelle 16b:
Histopathologische Befunde der Organe der Wildtypmäuse

Tier-Nr.	Sex	Phäno- typ	Organ	Histopathologische Befunde
20951	w	Wildtyp	Niere	Nichteitrige interstitielle Herdnephritis, herdförmige interstitielle Fibrose, nicht-eitrige Pyelitis
			Leber	Vakuolierung der Leberzellen (typisch für Glycogeneinlagerung)
			Milz	Follikuläre Hyperplasie, mgr. Hämosiderose
20848	w	Wildtyp	Niere	Kleinherdige nicht-eitrige interstitielle Infiltration mit lymphozytärer und histozytärer Beteiligung
			Leber	Vakuolierung der Leberzellen (typisch für Glycogeneinlagerung)
			Milz	Follikuläre Hyperplasie, mgr. Hämosiderose
			Pankreas	Inseln wirken vergrößert
21292	m	Wildtyp	Niere	Nicht-eitrige interstitielle Herdnephritis mit lymphozytärer und histozytärer Beteiligung
			Leber	Vakuolierung der Leberzellen (typisch für Glycogeneinlagerung)
			Milz	Follikuläre Hyperplasie, Hämosiderose
20944	m	Wildtyp	Niere	Herdförmig nicht-eitrige interstitielle Nephritis,
			Leber	Vakuolierung der Leberzellen (typisch für Glycogeneinlagerung)
			Milz	Lymphatische Hyperplasie
			Pankreas	Inseln wirken vergrößert
31741	w	Wildtyp	Niere	Herdförmig nicht-eitrige interstitielle Nephritis, fokale nicht-eitrige Pyelitis
			Leber	Hyperämie, vereinzelt perivaskuläre Rundzellinfiltrate
			Milz	Lymphatische Hyperplasie, monomorphes Zellbild
			Pankreas	Inseln wirken vergrößert
31638	m	Wildtyp	Niere	Herdförmig nicht-eitrige interstitielle Nephritis, nicht-eitrige Pyelitis
			Leber	Hyperämie
			Milz	Lymphatische Hyperplasie, monomorphes Zellbild
31364	m	Wildtyp	Niere	Nicht-eitrige Pyelitis
			Leber	Hyperämie
			Milz	Lymphatische Hyperplasie, monomorphes Zellbild
31434	w	Wildtyp	Niere	Chronisch nicht-eitrige interstitielle Herdnephritis
			Leber	Hyperämie
			Milz	Lymphatische Hyperplasie, monomorphes Zellbild

4.4 Klinisch-chemische Parameter

Zur Untersuchung der klinisch-chemischen Parameter wurden je 20 männliche und weibliche mutante Mäusen sowie je 20 männliche und weibliche Wildtypwurfgeschwister im Alter von 12, 18 und 24 Wochen untersucht (Tab. 18, 19 und 20). Folgende Parameter wurden im Plasma analysiert: Natrium (Na), Kalium (K), Kalzium (Ca), Chlorid (Cl), Phosphat (P), Gesamtprotein (GP), Harnstoff (HST), Kreatinin (KREA), Harnsäure (HS), Cholesterin (CHO), Kreatinkinase (CK), Triglyceride (TG), Alanin-Amino-Transferase (ALT), Aspartat-Amino-Transferase (AST), Alkalische Phosphatase (AP), Amylase (AMY) und Glukose (GLS). Desweiteren wurden die Parameter Harnstoff (HST) und Glukose (GLS) im Urin gemessen.

4.4.1 Varianzanalyse

Mittels Varianzanalyse wurden die Einflüsse der Gruppe, des Geschlechts und des Alters sowie die Interaktion zwischen Gruppe und Geschlecht auf die klinisch-chemischen Parameter auf Signifikanz geprüft. Die Gruppe hatte einen signifikanten Effekt auf den Harnstoff- (im Blut und im Urin), Gesamtprotein-, Glukose- und Triglyceridwert sowie auf die alkalische Phosphatase- und die Amylase-Aktivität. Auf die anderen Parameter übte die Gruppe keinen Effekt aus. Das Geschlecht hatte einen signifikanten Effekt auf die Harnstoff-, Gesamtprotein-, Glukose- und Triglyceridkonzentration sowie auf die alkalische Phosphatase- und die Amylase-Aktivität. Auf die anderen Parameter hatte das Geschlecht keinen Effekt. Die Interaktion zwischen Gruppe und Geschlecht hatte nur einen Effekt auf die Harnstoffkonzentration im Blut der Mäuse. Das Alter übte einen signifikanten Einfluss auf den Harnstoff- und Glukosewert und die alkalische Phosphatase-Aktivität aus. Bezüglich der klinisch-chemische Parameter K^+ , Na^+ , Ca^{2+} , P^- , Cl^- , KREA, HS, CHO, CK, ALT und AST wurden keine signifikanten Einflüsse von Gruppe, Geschlecht, Gruppe x Geschlecht und Alter beobachtet (Tab. 17).

Tabelle 17:
Einfluss von Gruppe, Sex, Gruppe x Sex und Alter auf die
klinisch-chemischen Parameter

Parameter	Gruppe	Sex	Gruppe x Sex	Alter
Na	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
K	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
Ca	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
Cl	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
P	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
GP	**	**	n.s.	n.s.
HST	***	**	*	**
HST im Urin	***	n.s.	n.s.	-
KREA	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
HS	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
CHO	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
CK	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
TG	***	*	n.s.	n.s.
GLS	**	**	n.s.	**
GLS im Urin	n.s.	n.s.	n.s.	-
ALT	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
AST	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
AP	***	***	n.s.	***
AMY	*	**	n.s.	n.s.

Die Tabelle zeigt die in der Varianzanalyse ermittelten F-Werte der Signifikanzen: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; n.s. = nicht signifikant

Tabelle 18:
Mittelwert (\bar{x}) und Standardabweichung (s_x) der klinisch-chemischen Parameter im Blut der Wildtypmäuse und der mutanten Mäuse im Alter von 12 Wochen

Parameter	Sex	n	Wildtyp		Mutante		Vergleich der Gruppen
			\bar{x}	s _x	\bar{x}	s _x	
Na (mmol/l)	m	20	145	8,4	147	7,02	n.s.
	w	20	145	6,3	147	8,1	n.s.
K (mmol/l)	m	20	4,4	0,5	4,4	0,5	n.s.
	w	20	4,1	0,3	4,1	0,4	n.s.
Ca (mmol/l)	m	20	2,3	0,1	2,3	0,1	n.s.
	w	20	2,3	0,1	2,3	0,1	n.s.
Cl (mmol/l)	m	20	105	10,8	107	7,2	n.s.
	w	20	107	12	108	10	n.s.
P (mmol/l)	m	20	2,2	0,2	2,1	0,3	n.s.
	w	20	2,2	0,3	2,0	0,3	n.s.
GP (g/dl)	m	20	5,4 ^a	0,2	5,6 ^a	0,2	*
	w	20	5,2	0,1	5,4	0,1	*
KREA (mg/dl)	m	20	0,24	0,1	0,27	0,1	n.s.
	w	20	0,25	0,1	0,26	0,1	n.s.
HST (mg/dl)	m	20	51 ^a	14	87 ^a	18	***
	w	20	48	18	69	16	***
HS (mg/dl)	m	20	1,5	1,2	1,6	1,1	n.s.
	w	20	1,5	1,1	1,5	1,0	n.s.
CHO (mg/dl)	m	20	119	19	117	14	n.s.
	w	20	113	9	112	10	n.s.
TG (mg/dl)	m	20	164 ^a	66	119 ^a	54	**
	w	20	121	51	87	25	**
GLS (mg/dl)	m	20	177 ^a	16	170 ^a	27	n.s.
	w	20	165	44	151	23	n.s.
CK (U/l)	m	20	138	21	176	26	n.s.
	w	20	137	20	175	24	n.s.
ALT (U/l)	m	20	13,2	5,5	11,2	4,3	n.s.
	w	20	11,8	3,5	9,8	2,6	n.s.
AST (U/l)	m	20	30	13	34	25	n.s.
	w	20	29	5	37	22	n.s.
AP (U/l)	m	20	145 ^b	16	173 ^b	18	**
	w	20	190	19	214	14	**
AMY (U/l)	m	20	3029 ^a	240	2889 ^a	312	n.s.
	w	20	2725	428	2715	307	n.s.

Signifikante Unterschiede zwischen männlichen (m) und weiblichen (w) Mäusen innerhalb der gleichen Gruppe sind durch die Buchstaben (a, b) und signifikante Unterschiede der Gruppen innerhalb der Geschlechter sind durch * gekennzeichnet. t-Test: ^{a,*} $p < 0,05$; ^{b,**} $p < 0,01$; ^{***} $p < 0,001$; n.s. = nicht signifikant

4.4.2 Harnstoff im Plasma

Bei den mutanten Mäusen war die Harnstoffkonzentration signifikant ($p < 0,001$) höher als bei den Wildtypwurfgeschwistern. Die männlichen Tiere beider Gruppen wiesen signifikant ($p < 0,05$ im Alter von 12, 18 und 24 Wochen) höhere Harnstoff-Spiegel im Plasma als die weiblichen Mäuse auf. Bei den mutanten Mäusen stieg die Harnstoffkonzentration mit zunehmendem Alter an, während sie bei den Wildtyptieren abnahm (Tab. 18, 19 und 20; Abb. 11).

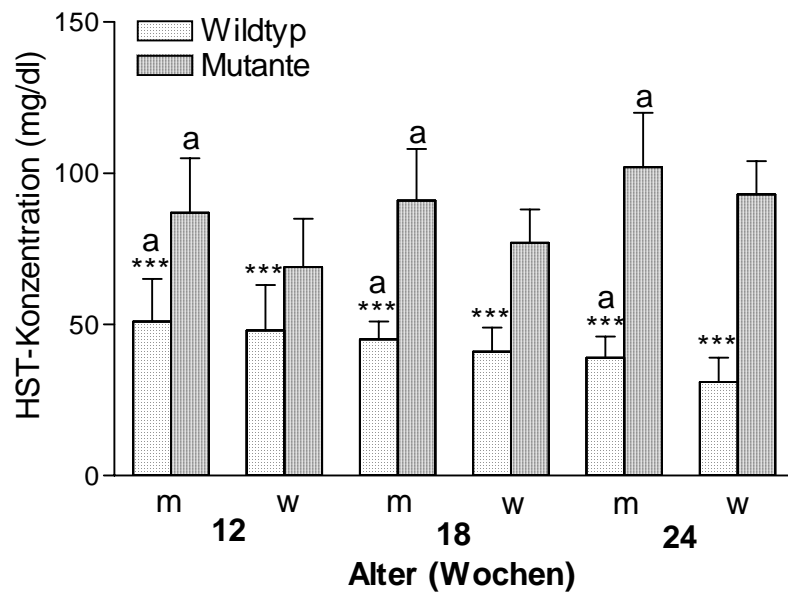


Abbildung 11: Vergleich der mittleren Harnstoffkonzentration im Plasma der Tiere beider Gruppen im Alter von 12, 18 und 24 Wochen. Signifikante Unterschiede zwischen männlichen (m) und weiblichen (w) Mäusen innerhalb der gleichen Gruppe sind durch Buchstaben (a) und signifikante Unterschiede der Gruppen innerhalb der Geschlechter sind durch * gekennzeichnet. t-Test: ^a $p < 0,05$; *** $p < 0,001$

4.4.3 Harnstoff im Urin

Die Analyse der Harnstoffkonzentration im Urin von je 20 männlichen und weiblichen mutanten Mäusen sowie von je 20 männlichen und weiblichen Wildtypmäusen im Alter von 24 Wochen ergab, dass die Harnstoffkonzentration im Urin der mutanten Mäuse signifikant ($p < 0,001$) niedriger war als bei den Wildtypmäusen (Tab. 20; Abb. 12).

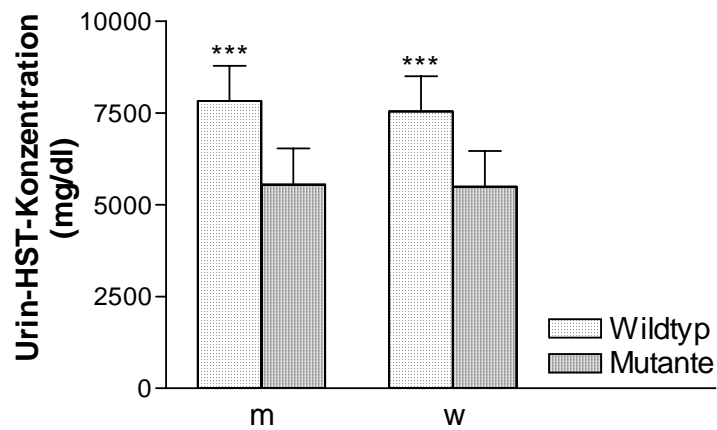


Abbildung 12: Vergleich der mittleren Harnstoffkonzentration im Urin von 24 Wochen alten Wildtypmäusen und mutanten Mäusen. Signifikante Unterschiede der Gruppen innerhalb der Geschlechter sind durch * gekennzeichnet. t-Test: *** $p < 0,001$

4.4.4 Gesamtprotein

Die Untersuchung der Gesamtproteinkonzentration der Mäuse zeigte, dass die mutanten Tiere im Mittel eine signifikant ($p < 0,05$) höhere Gesamtproteinkonzentration im Plasma aufwiesen als die Wildtypiere. Das Geschlecht hatte ebenfalls einen Effekt auf die Gesamtproteinkonzentration. Bei männlichen Tieren beider Gruppen war die Gesamtproteinkonzentration im Plasma signifikant ($p < 0,05$) höher als bei den weiblichen Tieren. Das Alter hatte dagegen bei beiden Gruppen keinen Effekt auf die ermittelten Gesamtproteinwerte (Tab. 18, 19 und 20; Abb. 13).

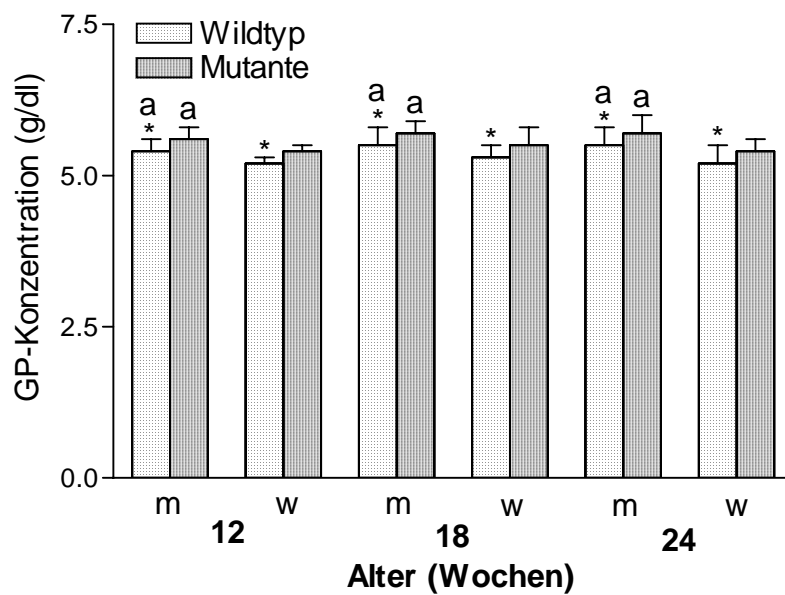


Abbildung 13: Vergleich der mittleren Gesamtproteinkonzentration im Plasma der Mäuse beider Gruppen im Alter von 12, 18 und 24 Wochen. Signifikante Unterschiede zwischen männlichen (m) und weiblichen (w) Mäusen innerhalb der gleichen Gruppe sind durch Buchstaben (a) und signifikante Unterschiede der Gruppen innerhalb der Geschlechter sind durch * gekennzeichnet. t-Test: ^a, * $p < 0,05$

4.4.5 Triglyceride

Die Analyse der Triglyceridkonzentration im Plasma der Mäuse ergab bei den mutanten Mäusen niedrigere Werte als bei den Wildtypmäusen. Dieser Unterschied war signifikant ($p < 0,01$ im Alter von 12 Wochen, $p < 0,001$ im Alter von 18 und 24 Wochen). Auch das Geschlecht hatte einen signifikanten ($p < 0,01$) Effekt auf die Triglyceridkonzentration im Plasma der Tiere. So waren bei den männlichen Mäusen die Triglyceridwerte im Plasma signifikant ($p < 0,05$ im Alter von 12 und 24 Wochen und $p < 0,01$ im Alter von 18 Wochen) höher als bei den weiblichen Tieren. Das Alter hatte dagegen bei beiden Gruppen keinen Effekt auf die Triglyceridkonzentration (Tab. 18, 19 und 20; Abb. 14).

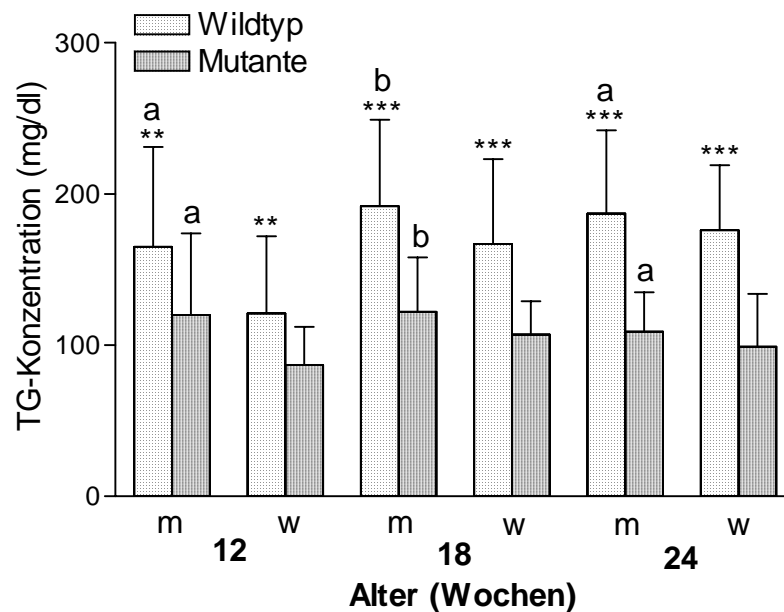


Abbildung 14: Vergleich der mittleren Triglyceridekonzentration im Plasma der Mäuse beider Gruppen im Alter von 12, 18 und 24 Wochen. Signifikante Unterschiede zwischen männlichen (m) und weiblichen (w) Mäusen innerhalb der gleichen Gruppe sind durch die Buchstaben (a, b) und signifikante Unterschiede der Gruppen innerhalb der Geschlechter sind durch * gekennzeichnet. t-Test: ^a $p < 0,05$; ^b, ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$

4.4.6 Glukose im Plasma

Die im Blut gemessenen Glukosespiegel lagen ab dem Alter von 18 Wochen sowohl bei den Wildtypmäusen als auch bei den mutanten Mäusen für männliche Tiere signifikant ($p < 0,05$) höher als für weibliche Tiere. Im Alter von 18 und 24 Wochen wiesen zudem die mutanten Mäuse eine signifikant ($p < 0,01$) niedrigere Glukosekonzentration im Plasma auf als die Wildtyptiere. Bei den mutanten Mäusen nahm die Glukosekonzentration im Plasma mit zunehmendem Alter tendenziell ab, während bei den Wildtyptieren keine einheitliche Tendenz festzustellen war (Tab. 18, 19 und 20; Abb. 15).

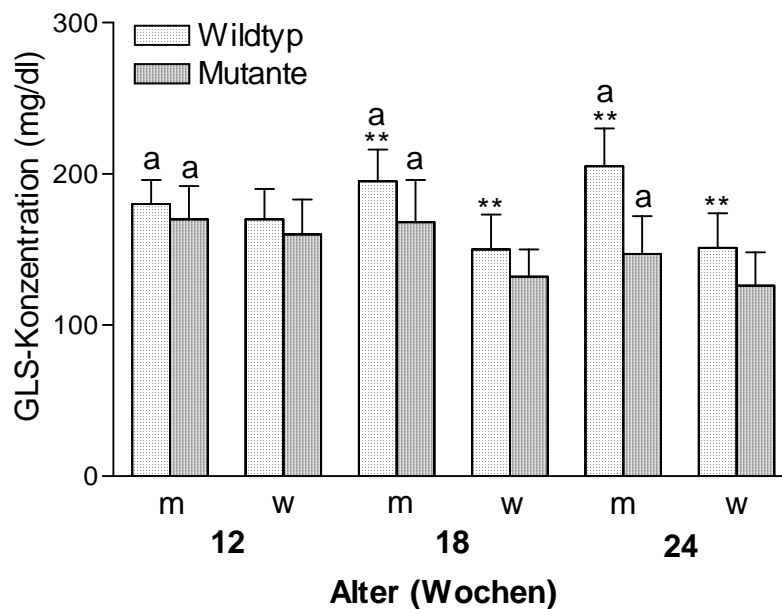


Abbildung 15: Vergleich der mittleren Glukosekonzentration im Plasma der Mäuse beider Gruppen im Alter von 12, 18 und 24 Wochen. Signifikante Unterschiede zwischen männlichen (m) und weiblichen (w) Mäusen innerhalb der gleichen Gruppe sind durch Buchstaben (a) und signifikante Unterschiede der Gruppen innerhalb der Geschlechter sind durch * gekennzeichnet. t-Test: ^a $p < 0,05$; ** $p < 0,01$

4.4.7 Glukose im Urin

Die Untersuchung der Glukosekonzentration im Urin von je 20 männlichen und weiblichen mutanten Tieren sowie von je 20 männlichen und weiblichen Wildtyptieren im Alter von 24 Wochen ergab, dass die Tiere beider Gruppen und Geschlechter keinen Unterschied bezüglich der Glukosekonzentration im Urin aufwiesen (Tab. 20; Abb. 16).

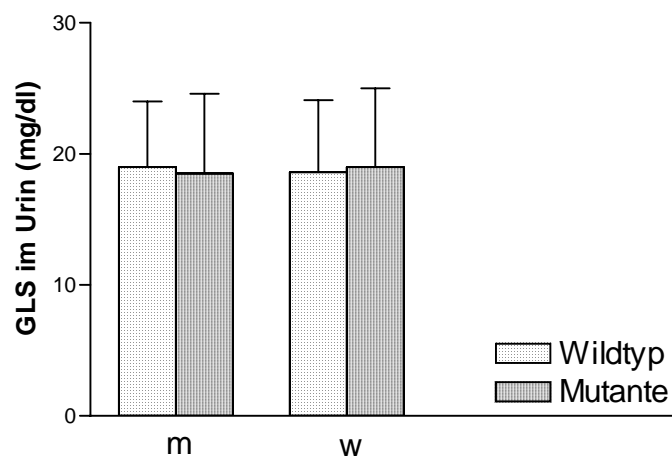


Abbildung 16: Vergleich der mittleren Glukosekonzentration im Urin der Wildtypmäuse und der mutanten Mäuse.

4.4.8 Amylase

Die Messung der Amylase-Aktivität im Plasma der Tiere beider Gruppen ergab bei den Mutanten im Alter von 18 und 24 Wochen signifikant ($p < 0,05$) niedrigere Werte als bei den Wildtyptieren. Die männlichen Tiere beider Gruppen wiesen eine höhere Amylase-Aktivität ($p < 0,05$) auf als die weiblichen Tiere (Tab. 18, 19 und 20; Abb. 17).

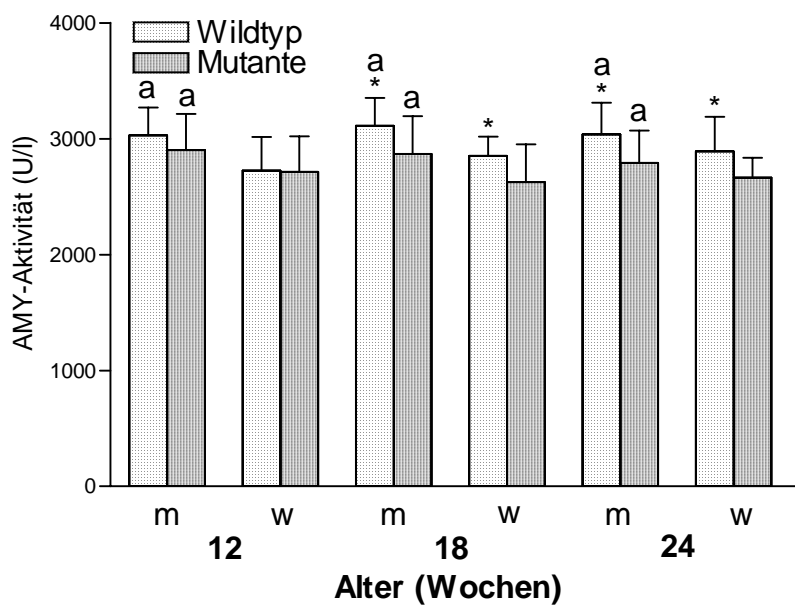


Abbildung 17: Vergleich der mittleren Amylase-Aktivität im Plasma der Mäuse beider Gruppen im Alter von 12, 18 und 24 Wochen. Signifikante Unterschiede zwischen männlichen (m) und weiblichen (w) Mäusen innerhalb der gleichen Gruppe sind durch Buchstaben (a) und signifikante Unterschiede der Gruppen innerhalb der Geschlechter sind durch * gekennzeichnet. t-Test: ^a * $p < 0,05$

4.4.9 Alkalische Phosphatase

Die mutanten Mäuse wiesen eine signifikant ($p < 0,01$ im Alter von 12, 18 und 24 Wochen) höhere alkalische Phosphatase-Aktivität im Plasma auf als die Wildtypiere. Das Geschlecht hatte ebenfalls einen signifikanten Effekt auf die alkalische Phosphatase-Aktivität. So wurde bei den weiblichen Tieren eine signifikant ($p < 0,01$) höhere alkalische Phosphatase-Aktivität als bei den männlichen Tieren festgestellt. Die alkalische Phosphatase-Aktivität im Plasma der Tiere beider Gruppen nahm mit zunehmendem Alter ab (Tab.18, 19 und 20; Abb. 18).

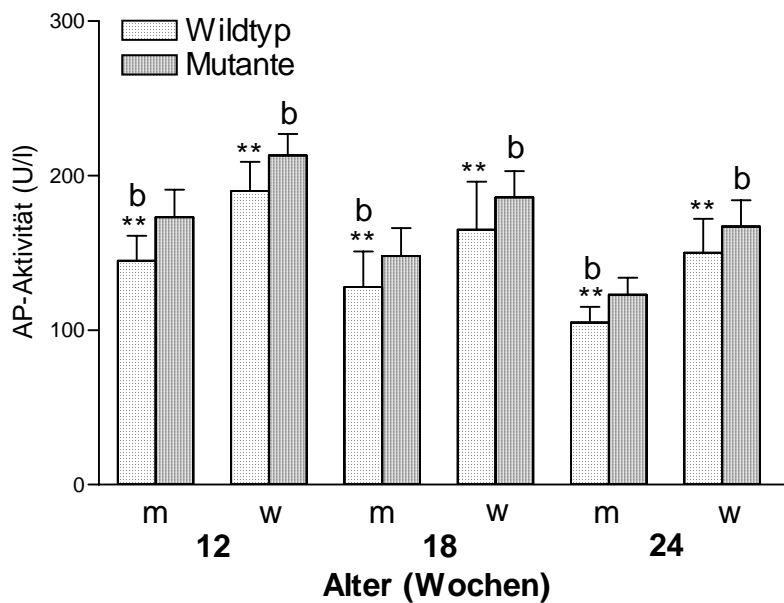


Abbildung 18: Vergleich der mittleren Alkalische Phosphatase-Aktivität im Plasma der Mäuse beider Gruppen im Alter von 12, 18 und 24 Wochen. Signifikante Unterschiede zwischen männlichen (m) und weiblichen (w) Mäusen innerhalb der gleichen Gruppe sind durch Buchstaben (b) und signifikante Unterschiede der Gruppen innerhalb der Geschlechter sind durch * gekennzeichnet. t-Test: ^b, ** $p < 0,01$

4.5 Blutbildparameter

Zur Beurteilung der Blutbildparameter wurden je 20 männliche und weibliche mutante Mäuse sowie je 20 männliche und weibliche Wildtypmäuse als Kontrollen untersucht. Die Messung wurde im Alter von 12, 18 und 24 Wochen durchgeführt (Tab. 22, 23 und 24). Folgende Parameter wurden gemessen: Leukozyten (WBK), Erythrozyten (RBK), Hämoglobin (Hb), mittleres korpuskuläres Hämoglobin (MCH), mittlere korpuskuläre Hämoglobinkonzentration (MCHC), Hämatokrit (HKT), mittleres korpuskuläres Volumen (MCV) und Thrombozyten (PLT).

4.5.1 Varianzanalyse

Mittels Varianzanalyse wurden die Einflüsse von Gruppe, Geschlecht, Alter sowie der Interaktion zwischen Gruppe und Geschlecht auf die Blutbildparameter geprüft. Die Gruppe hatte einen signifikanten Effekt auf die Anzahl der Erythrozyten (RBK), die Hämoglobinkonzentration (Hb), den Hämatokrit (HKT), und das mittlere korpuskuläre Volumen (MCV). Auf die anderen Parameter übte die Gruppe keinen Effekt aus. Das Geschlecht hatte keinen Einfluss auf die Blutbildparameter. Das Alter hatte einen signifikanten Effekt auf RBK, Hb, HKT und MCV. Die Interaktion zwischen Gruppe und Geschlecht übte einen Einfluss auf die Parameter RBK, Hb und HKT aus. Hinsichtlich der Blutbildparameter WBK, PLT, MCH, MCHC wurden keine Einflüsse von Gruppe, Geschlecht, Gruppe x Geschlecht sowie Alter auf die ermittelten Werte festgestellt (Tab. 21).

Tabelle 21: Einfluss von Gruppe, Sex, Gruppe x Sex und Alter auf verschiedene Blutbildparameter				
Parameter	Gruppe	Sex	Gruppe x Sex	Alter
WBK	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
RBK	**	n.s.	*	*
Hb	**	n.s.	*	*
MCH	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
MCHC	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
HKT	***	n.s.	*	*
MCV	***	n.s.	n.s.	**
PLT	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
Die Tabelle gibt die in der Varianzanalyse ermittelten F-Werte der Signifikanzen wieder: * p< 0,05; ** p< 0,01; *** p< 0,001; n.s. = nicht signifikant				

Tabelle 22:
Mittelwert (\bar{x}) und Standardabweichung (s_x) der Blutbildparameter der Wildtypmäuse und der mutanten Mäuse im Alter von 12 Wochen

Parameter	Sex	n	Wildtyp		Mutante		Vergleich der Gruppen
			\bar{x}	s _x	\bar{x}	s _x	
WBK (10 ³ /ml)	m	20	5,3	1,1	5,4	1,4	n.s.
	w	20	5,4	1,2	5,5	1,1	n.s.
RBK (10 ⁶ /ml)	m	20	9,5	0,7	9,4	0,7	n.s.
	w	20	9,6	0,9	9,5	0,7	n.s.
Hb (g/dl)	m	20	14,7	1,1	14,3	1,4	n.s.
	w	20	14,2	1,5	14,3	1,3	n.s.
MCH (pg)	m	20	15,5	0,7	15,5	0,4	n.s.
	w	20	15,7	0,5	15,6	0,4	n.s.
MCHC (g/dl)	m	20	32,8	0,8	33,3	0,6	n.s.
	w	20	33,0	0,6	33,4	0,8	n.s.
HKT (%)	m	20	44,9	3,3	44	3,0	n.s.
	w	20	46,0	4,5	45	3,3	n.s.
MCV (μm ³)	m	20	47,2	0,7	46,4	0,8	n.s.
	w	20	47,6	0,5	46,9	0,8	n.s.
PLT (10 ³ /ml)	m	20	611	112	602	140	n.s.
	w	20	545	125	589	138	n.s.

t-Test: n.s. = nicht signifikant

Tabelle 23:
Mittelwert (\bar{x}) und Standardabweichung (s_x) der Blutbildparameter der Wildtypmäuse und der mutanten Mäuse im Alter von 18 Wochen

Parameter	Sex	n	Wildtyp		Mutante		Vergleich der Gruppen
			\bar{x}	s_x	\bar{x}	s_x	
WBK (10^3 /ml)	m	20	6,1	1,8	6,1	2,2	n.s.
	w	20	5,7	1,7	5,6	2,3	n.s.
RBK (10^6 /ml)	m	20	9,6	0,6	9,0	0,5	*
	w	20	9,7	0,3	9,1	0,6	*
Hb (g/dl)	m	20	15,0	0,9	14,0	1,1	*
	w	20	14,7	0,8	13,9	1,2	*
MCH (pg)	m	20	15,6	0,3	15,3	0,4	n.s.
	w	20	15,8	0,4	15,7	0,4	n.s.
MCHC (g/dl)	m	20	33,0	0,5	33,0	0,7	n.s.
	w	20	33,0	0,6	33,4	0,4	n.s.
HKT (%)	m	20	46	3,1	43,2	2,9	*
	w	20	45	1,8	42,9	3,7	*
MCV (μm^3)	m	20	47,4	0,9	45,2	0,6	*
	w	20	47,7	0,5	45,6	1,5	*
PLT (10^3 /ml)	m	20	611	115	600	112	n.s.
	w	20	608	113	614	100	n.s.

Signifikante Unterschiede der Gruppen innerhalb der Geschlechter sind durch * gekennzeichnet.
t-Test: * $p < 0,05$; n.s. = nicht signifikant

Tabelle 24:
Mittelwert (\bar{x}) und Standardabweichung (s_x) der Blutbildparameter der Wildtypmäuse und der mutanten Mäuse im Alter von 24 Wochen

Parameter	Sex	n	Wildtyp		Mutante		Vergleich der Gruppen
			\bar{x}	s _x	\bar{x}	s _x	
WBK (10 ³ /ml)	m	20	6,1	1,0	6,9	3,0	n.s.
	w	20	5,4	1,8	6,5	2,9	n.s.
RBK (10 ⁶ /ml)	m	20	9,8	0,8	9,0	0,6	*
	w	20	9,6	0,6	9,1	0,9	*
Hb (g/dl)	m	20	15,4	1,4	14,1	1,0	*
	w	20	14,8	1,1	13,8	1,2	*
MCH (pg)	m	20	15,7	0,9	15,3	0,5	n.s.
	w	20	15,6	0,5	15,2	0,4	n.s.
MCHC (g/dl)	m	20	33,3	2,1	34	0,9	n.s.
	w	20	33,0	1	33	0,4	n.s.
HKT (%)	m	20	46	3,8	43	3,4	*
	w	20	45	3,1	42	3,5	*
MCV (µm ³)	m	20	47,2	0,4	45,4	0,7	*
	w	20	47,2	0,7	45,5	1,2	*
PLT (10 ³ /ml)	m	20	580	87	619	153	n.s.
	w	20	503	220	580	152	n.s.

Signifikante Unterschiede der Gruppen innerhalb der Geschlechter sind durch * gekennzeichnet.
t-Test: * p<0,05; n.s. = nicht signifikant

4.5.2 Erythrozytenzahl

Die Bestimmung der Anzahl der roten Blutkörperchen (RBK) ergab, dass sich die Werte der mutanten Tiere und der Wildtypiere im Alter von 12 Wochen nicht unterschieden. Im Alter von 18 und 24 Wochen wiesen die mutanten Tiere eine signifikant ($p < 0,05$) niedrigere Anzahl roter Blutkörperchen auf als die Wildtypiere. Das Geschlecht übte keinen Einfluß auf die Anzahl der roten Blutkörperchen aus (Tab. 22, 23 und 24; Abb. 19).

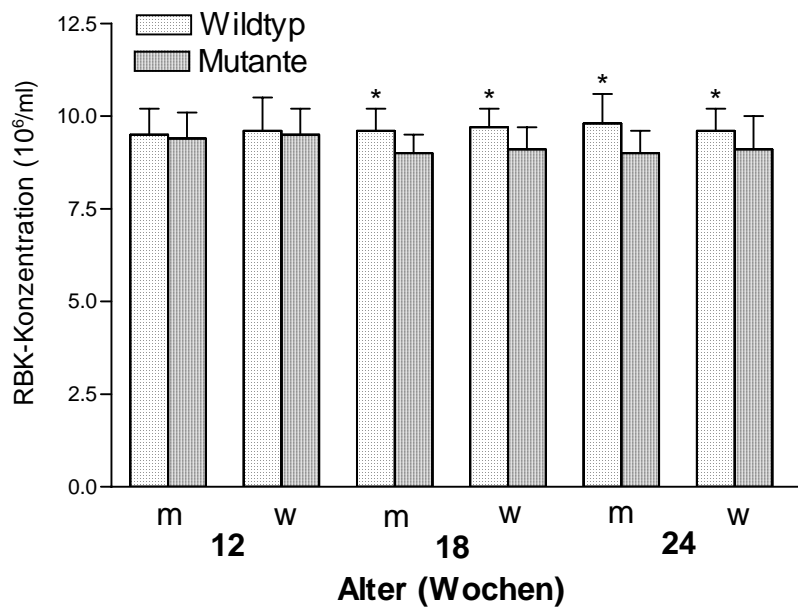


Abbildung 19: Vergleich der mittleren Anzahl der roten Blutkörperchen im Blut der Tiere beider Gruppen im Alter von 12, 18 und 24 Wochen. Signifikante Unterschiede der Gruppen innerhalb der Geschlechter sind durch * gekennzeichnet. t-Test: * $p < 0,05$

4.5.3 Hämoglobinkonzentration

Im Alter von 12 Wochen zeigten die Mäuse beider Gruppen keinen Unterschied hinsichtlich der Hämoglobinkonzentration im Blut. Im Alter von 18 und 24 Wochen wurde im Blut der mutanten Mäuse eine signifikant ($p < 0,05$) niedrigere Hämoglobinkonzentration als im Blut der Wildtypiere gemessen. Das Geschlecht hatte keinen Effekt auf die Hämoglobinwerte der Mäuse (Tab. 22, 23 und 24; Abb. 23).

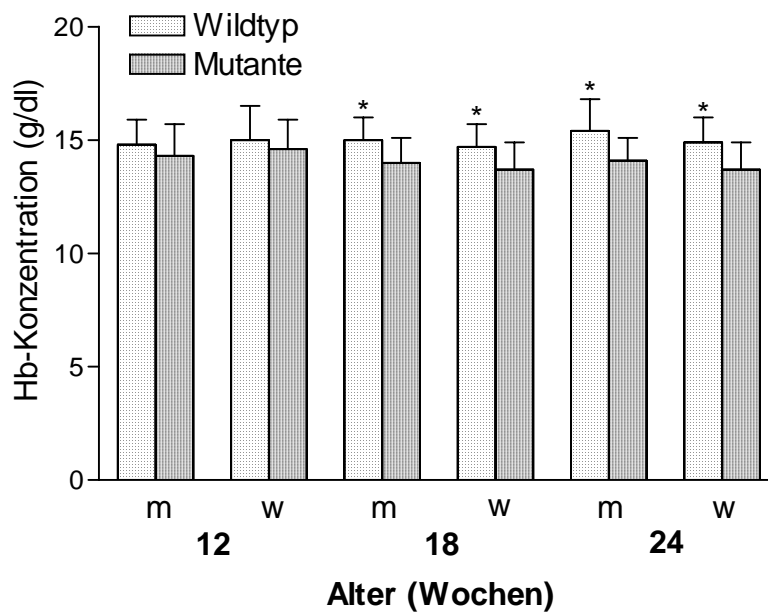


Abbildung 20: Vergleich der mittleren Hämoglobinkonzentration der Mäuse beider Gruppen. Signifikante Unterschiede der Gruppen innerhalb der Geschlechter sind durch * gekennzeichnet. t-Test: * $p < 0,05$

4.5.4 Hämatokrit

Hinsichtlich des Hämatokrits der Mäuse beider Gruppen wurde im Alter von 12 Wochen kein Unterschied festgestellt. Die Messung des Hämatokrits im Alter von 18 und 24 Wochen ergab bei den mutanten Tieren signifikant ($p < 0,05$) niedrigere Werte als bei den Wildtyptieren. Das Geschlecht hatte keinen Einfluss auf den Hämatokrit (Tab. 22, 23 und 24; Abb. 21).

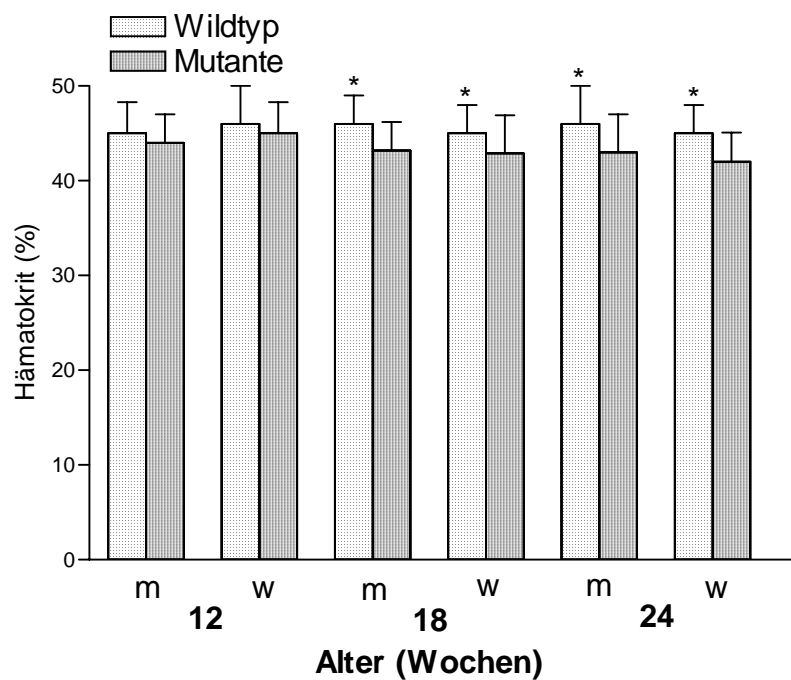


Abbildung 21: Vergleich des mittleren Hämatokrits der Tiere beider Gruppen im Alter von 12, 18 und 24 Wochen. Signifikante Unterschiede der Gruppen innerhalb der Geschlechter sind durch * gekennzeichnet. t-Test: * $p < 0,05$

4.5.5 Mittleres korpuskuläres Volumen

Die Bestimmung des mittleren korpuskulären Volumens (MCV) der Tiere beider Gruppen ergab im Alter von 12 Wochen keinen Unterschied. Im Alter von 18 und 24 Wochen zeigten die mutanten Tiere signifikant ($p < 0,05$) niedrigere MCV-Werte als die Wildtypmäuse. Das Geschlecht hatte keinen Effekt auf das MCV (Tab. 22, 23 und 24; Abb. 22).

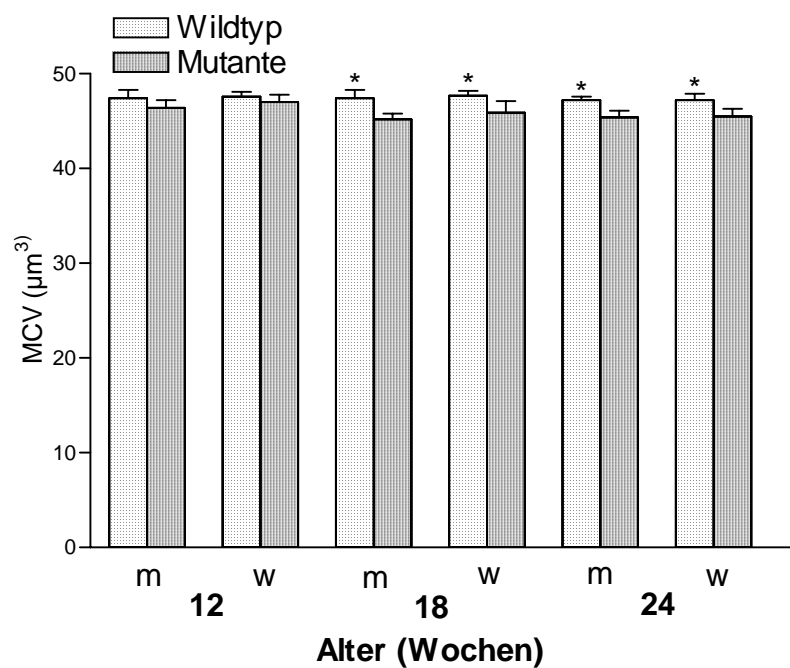


Abbildung 22: Vergleich des mittleren korpuskulären Volumens der Mäuse beider Gruppen im Alter von 12, 18 und 24 Wochen. Signifikante Unterschiede der Gruppen innerhalb der Geschlechter sind durch * gekennzeichnet. t-Test: * $p < 0,05$

4.6 Albuminausscheidung im Urin der Mäuse

Die Untersuchung der Albuminausscheidung im Urin wurde bei je 7 männlichen und weiblichen mutanten Tieren und ebenso vielen Wildtypmäusen im Alter von 24 Wochen durchgeführt. Die Analyse der Proteine im Harn erfolgte mit Hilfe der SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE). Anhand eines Proteinlängenstandard (M) wurde auf den gefärbten Gelen die Laufhöhe des Albumins (Bovines Serumalbumin, 92 kDa) bestimmt und diese Region vergleichend bei den Mutanten und Kontrollen untersucht, wobei keine augenscheinlichen Unterschiede festzustellen waren (Abb. 23).

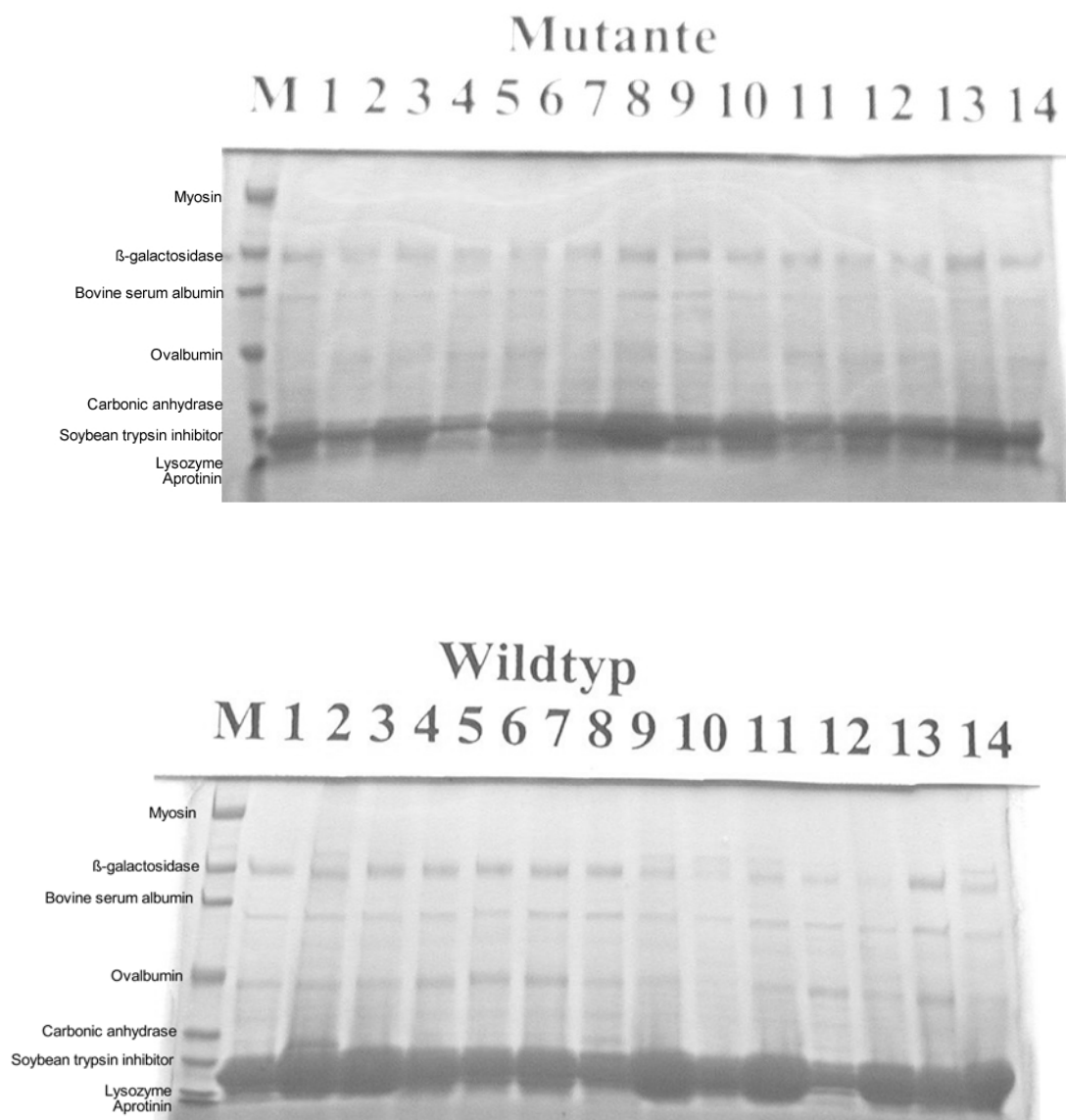


Abbildung 23: Vergleich der Albuminausscheidung im Harn der mutanten Mäuse und Wildtypmäuse mittels SDS-PAGE. **M:** Proteinlängenstandard Broad Range (Art. Nr 161-0318, Bio-Rad Laboratories)

4.7 Grobkartierung der HST001 Mutation

Während in den genetisch einheitlichen F1-Hybriden der Auskreuzungsanpaarungen heterozygote Mutanten und Wildtypwurfgeschwister im Hinblick auf die Harnstoffkonzentration im Blut zu gleichen Teilen auftraten (Test nach DIXON und MOOD (SACHS, 2002)), waren ca. 50% der Nachkommen aus Rückkreuzungsanpaarungen (n=125 aus 256) aufgrund der routinemäßig zweimalig durchgeführten Blutharnstoffbestimmung nicht eindeutig einer der beiden Gruppen der Mutanten und der Wildtyptiere zuzuordnen. Als Ursache für diese Beobachtung wurde der heterogene genetische Hintergrund in den Nachkommen der Rückkreuzungsanpaarungen vermutet. Die fraglichen Tiere wurden nicht zur Kartierung der Mutation in der Linie HST001 verwendet.

Zur Kartierung der kausalen Mutation der Linie HST001 wurden DNA-Proben aus Schwanzspitzenbiopsien von 36 mutanten Tieren und 32 Wildtyptieren analysiert. Die Kopplungsanalyse der gepoolten Proben (3 Mutanten- und 2 Wildtyp-Pools) zeigte für alle Pools eine deutliche Kopplung mit genetischen Markern des Chromosoms 7. Dies wurde durch die Analyse der Einzelproben mit den entsprechenden Markern bestätigt. Die Tabellen 25 a und b geben einen Überblick über die Ergebnisse der Genotypisierung der Einzelproben für die verwendeten Marker des Chromosoms 7. Die stärkste Kopplung ergab sich mit dem Marker D7Mit238. Demzufolge ist davon auszugehen, dass die Mutation in enger Nachbarschaft zu diesem Marker liegt. Um die Lage der Mutation weiter einengen zu können, ist die Analyse der bereits verwendeten DNA-Proben und weiterer Proben mit zusätzlichen Markern nötig (Feinkartierung).

Tabelle 25a:
Kopplungsanalyse der polymorphen Mikrosatellitenmarker des Chromosoms 7 in den mutanten Mäusen

Phänotyp	Maus-ID	Locus 1.2 D7 Mit 340	Locus 3.4 D7 Mit 191	Locus 18.0 D7 Mit 270	Locus 23.0 D7 Mit 158	Locus 53.0 D7 Mit 238	Locus 57.5 D7 Mit 284	Locus 72.4 D7 Mit 189
Mutant 1	39644	C3H/C57	C3H/C57	C3H/C57	C3H/C57	C3H/C57	C57	C57
Mutant 2	39645	C3H/C57	C3H/C57	C3H/C57	C3H/C57	C3H/C57	C3H/C57	C3H/C57
Mutant 3	40536	C3H/C57	C3H/C57	C3H/C57	C3H/C57	C3H/C57	C57	C57
Mutant 4	40339	C3H/C57	C3H/C57	C3H/C57	C3H/C57	C3H/C57	C3H/C57	C3H/C57
Mutant 5	47463	C57	C57	C57	no data	no data	C3H/C57	C3H/C57
Mutant 6	40142	C57	C57	C57	C3H/C57	C3H/C57	C3H/C57	C3H/C57
Mutant 7	40441	C57	C57	C57	C57	C3H/C57	C3H/C57	C3H/C57
Mutant 8	36557	C57	C57	C57	C57	C57	C57	C57
Mutant 9	36559	C57	C57	C3H/C57	C3H/C57	C3H/C57	C3H/C57	C3H/C57
Mutant 10	36964	C3H/C57	C3H/C57	C3H/C57	C3H/C57	C3H/C57	C57	C57
Mutant 11	36867	C57	C57	C57	C57	C3H/C57	C3H/C57	C3H/C57
Mutant 12	36756	C57	C57	C57	C57	C3H/C57	C57	C57
Mutant 13	36957	no data	no data	C57	no data	C3H/C57	C3H/C57	C3H/C57
Mutant 14	36862	C57	C57	C57	C57	C3H/C57	C3H/C57	C3H/C57
Mutant 15	36563	C57	C57	C57	C57	C3H/C57	C3H/C57	C3H/C57
Mutant 16	37251	C57	C57	C57	C3H/C57	C3H/C57	C3H/C57	C3H/C57
Mutant 17	37152	C57	C3H/C57	C3H/C57	C3H/C57	C3H/C57	C57	C57
Mutant 18	36769	C57	C57	C57	C57	C3H/C57	C3H/C57	C3H/C57
Mutant 19	37156	C57	C57	C3H/C57	C3H/C57	C3H/C57	C3H/C57	C3H/C57
Mutant 20	36723	C57	C57	C57	C3H/C57	C3H/C57	C3H/C57	C3H/C57
Mutant 21	35663	C57	C57	C3H/C57	C3H/C57	C57	C57	C57
Mutant 22	35967	C57	C3H/C57	C3H/C57	C3H/C57	C3H/C57	C3H/C57	C3H/C57
Mutant 23	35556	C57	C57	C57	C57	C3H/C57	C3H/C57	C3H/C57
Mutant 24	36724	C57	C57	C57	C57	C3H/C57	C3H/C57	C3H/C57
Mutant 25	34756	C57	C57	C57	C57	C3H/C57	C3H/C57	C3H/C57
Mutant 26	34458	C57	C3H/C57	C3H/C57	C57/C3H	C3H/C57	C3H/C57	C3H/C57
Mutant 27	33061	C57	C3H/C57	C57	C57	C57	C57	C57
Mutant 28	35455	C57	C3H/C57	C3H/C57	C3H/C57	C3H/C57	C3H/C57	C3H/C57
Mutant 29	37255	C57	C3H/C57	C3H/C57	C3H/C57	C3H/C57	C3H/C57	C3H/C57
Mutant 30	34613	C57	C57	C3H/C57	C3H/C57	C3H/C57	C3H/C57	C3H/C57
Mutant 31	34655	C57	C3H/C57	C3H/C57	C3H/C57	C3H/C57	C3H/C57	C3H/C57
Mutant 32	37058	C57	C3H/C57	C3H/C57	C3H/C57	C3H/C57	C57	C57
Mutant 33	37059	C57	C3H/C57	C3H/C57	C3H/C57	C3H/C57	C3H/C57	C3H/C57
Mutant 34	35167	C57	C57	C57	C57H	C3H/C57	C57	C57
Mutant 35	37350	C57	C57	C3H/C57	C3H/C57	C3H/C57	C57	C57
Mutant 36	34608	C57	C57	C57	C3H/C57	C3H/C57	C3H/C57	C3H/C57

Tabelle 25b:
Kopplungsanalyse der polymorphen Mikrosatellitenmarker des Chromosoms 7 in den Wildtypmäusen

Phänotyp	Maus-ID	Locus 1.2 D7 Mit 340	Locus 3.4 D7 Mit 191	Locus 18.0 D7 Mit 270	Locus 23.0 D7 Mit 158	Locus 53.0 D7 Mit 238	Locus 57.5 D7 Mit 284	Locus 72.4 D7 Mit 189
Wildtyp 1	36952	C57	C57	C57	C57	C57	C57	C57
Wildtyp 2	36853	C57	C57	C57	C57	C57	C57	C57
Wildtyp 3	36765	C3H/C57	C3H/C57	C57	C57	C57	C57	C57
Wildtyp 4	36666	C3H/C57	C3H/C57	C3H/C57	C3H/C57	C57	C57	C57
Wildtyp 5	36961	C57	C57	C57	C57	C57	C3H/C57	C3H/C57
Wildtyp 6	36962	C3H/C57	C3H/C57	C57	C57	C57	C3H/C57	C3H/C57
Wildtyp 7	36766	C3H/C57	C3H/C57	C3H/C57	C3H/C57	C57	C57	C57
Wildtyp 8	36663	C57	C57	C57	C57	C57	C57	C57
Wildtyp 9	36967	C57	C3H/C57	C57	C57	C3H/C57	C3H/C57	C3H/C57
Wildtyp 10	37356	C57	C3H/C57	C3H/C57	C3H/C57	C57	C57	C57
Wildtyp 11	37064	C57	C3H/C57	C57	C57	C57	C57	C57
Wildtyp 12	37122	C57	C3H/C57	C3H/C57	C3H/C57	C57	C57	C57
Wildtyp 13	36064	C57	C57	C57	C57	C57	C57	C57
Wildtyp 14	35354	C57	C57	C57	C57	C57	C57	C57
Wildtyp 15	34472	C57	C57	C57	C57	C57	C57	C57
Wildtyp 16	34459	C57	C57	C57	C57	C57	C3H/C57	C3H/C57
Wildtyp 17	34551	C57	C3H/C57	C3H/C57	C3H/C57	C57	C57	C57
Wildtyp 18	32462	C57	C57	C3H/C57	C3H/C57	C3H/C57	C3H/C57	C3H/C57
Wildtyp 19	36071	C57	C3H/C57	C3H/C57	C3H/C57	C57	C57	C57
Wildtyp 20	36868	C57	C57	C57	C57	C57	C57	C57
Wildtyp 21	34811	C57	C3H/C57	C3H/C57	C3H/C57	C3H/C57	C57	C57
Wildtyp 22	36865	C57	C3H/C57	C57	C57	C57	C57	C57
Wildtyp 23	37157	C57	C57	C57	C57	C57	C57	C57
Wildtyp 24	37160	C57	C3H/C57	C3H/C57	C3H/C57	C57	C57	C57
Wildtyp 25	35357	C57	C57	C57	C57	C57	C57	C57
Wildtyp 26	39546	C57	C57	C57	C57	C57	C57	C57
Wildtyp 27	37667	C57	C3H/C57	C3H/C57	C3H/C57	C3H/C57	C3H/C57	C3H/C57
Wildtyp 28	37566	C57	C3H/C57	C3H/C57	C57	C57	C3H/C57	C3H/C57
Wildtyp 29	32664	C57	C3H/C57	C3H/C57	C3H/C57	C3H/C57	C3H/C57	C3H/C57
Wildtyp 30	33065	C57	C57	C57	C57	C57	C57	C57
Wildtyp 31	34664	C57	C3H/C57	C3H/C57	C57	C57	C3H/C57	C3H/C57
Wildtyp 32	37548	C57	C3H/C57	C57	C57	C57	C57	C57

5 DISKUSSION

5.1 Charakterisierung des Phänotyps der Mausmutante HST001

Um den pathologischen Phänotyp der dominant vererbten Mutation in der Linie HST001 zu charakterisieren, wurde eine systematische Untersuchung der Körpergewichtsentwicklung, zahlreicher klinisch-chemischer und hämatologischer Parameter, der absoluten und relativen Organgewichte sowie der Histologie der inneren Organe der mutanten Mäuse im Vergleich zu den Wildtyptieren durchgeführt. Dazu wurden heterozygote Mutanten mit C3H-Mäusen verpaart und die Nachkommen anhand der unterschiedlichen Harnstoffkonzentration im Blut in die beiden Gruppen der Mutanten und der Wildtypwurfgeschwister eingeteilt. Im genetischen Hintergrund des C3H-Inzuchtstammes zeigte die dominante Mutation eine vollständige phänotypische Penetranz. Zur Untersuchung der Körpergewichtsentwicklung standen jeweils 35 männliche und weibliche mutante Mäuse und die gleiche Anzahl Wildtypwurfgeschwister zur Verfügung. Die Untersuchung der klinisch-chemischen Parameter und der Blutbildparameter wurde bei jeweils 20 männlichen und weiblichen Mäusen pro Gruppe durchgeführt. Zur Untersuchung der absoluten und relativen Organgewichte sowie zur histologischen Untersuchung wurden jeweils 5 männliche und weibliche Mäuse pro Gruppe verwendet.

Die mutanten Mäuse wiesen eine pathologische Erhöhung der Harnstoffkonzentration im Blut im Alter von 12, 18 und 24 Wochen auf, wobei mit zunehmendem Alter die Harnstoffkonzentration im Blut zunahm, während sie bei den Wildtyptieren abnahm. Im Alter von 24 Wochen war die mittlere Harnstoffkonzentration im Blut der mutanten Mäuse mehr als doppelt so hoch wie bei den Wildtyptieren. Im selben Alter war eine signifikant niedrigere Harnstoffkonzentration im Urin der mutanten Mäuse als im Harn der Wildtypmäuse festzustellen. Die mutanten Tiere nahmen mehr Futter auf, trotzdem zeigten sie geringere Zunahmen und ein geringeres Körpergewicht als die Wildtypwurfgeschwister. Veränderungen im Blut der Mutanten wurden für die Parameter Gesamtprotein, Glukose, alkalische Phosphatase, Amylase und Triglyceride festgestellt. Mutante Tiere wiesen eine Erhöhung der Gesamtproteinkonzentration und der alkalische Phosphatase-Aktivität auf, während die Glukosekonzentration, die Amylase-Aktivität und die Triglyceridkonzentration im Blut herabgesetzt waren. Die Mutanten wiesen außerdem im fortgeschrittenen Alter eine

Verminderung der Anzahl der roten Blutkörperchen, der Hämoglobinkonzentration, des Hämatokrits und des mittleren korpuskulären Volumens auf.

Zur Abschätzung der biologischen Signifikanz der im Alter von 12 Wochen abweichenden klinisch-chemischen Parameter wurden die in der Linie HST001 erhobene Werte mit verfügbaren Werten der C3H-Stammzuchttiere (HOWALDT, persönliche Mitteilung) verglichen (Tab. 26). Auch dieser Vergleich zeigt die pathologische Veränderung von Harnstoff und Triglyceriden bei den Mutanten beiderlei Geschlechts.

Tabelle 26:							
Mittelwert (\bar{x}) und Standardabweichung (s _x) der veränderten klinisch-chemischen Parameter der Linie HST001 im Vergleich zu Tieren der C3H-Stammzucht im Alter von 12 Wochen							
Parameter	Sex	Linie HST001				C3H-Stammzucht (M. Howaldt, persönliche Mitteilung)	
		Mutante		Wildtyp			
		\bar{x}	s _x	\bar{x}	s _x	\bar{x}	s _x
HST (mg/dl)	m	87	18	51	14	50	6
	w	69	16	48	18	41	9
TG (mg/dl)	m	119	54	164	66	152	91
	w	87	25	121	51	193	33

5.2 Körpergewichtsentwicklung und Wachstum

Die Registrierung der Gewichtsdaten begann bei allen Mäusen ab einem Alter von 4 Wochen. Ab der 6. Woche zeigten die mutanten Mäuse eine geringere Gewichtszunahme. Sie waren signifikant leichter als die Wildtypwurfgeschwister und wiesen im Alter von 8 Monaten auch eine kürzere Nasen-Rumpf-Länge auf. Die meisten relativen Organgewichte zeigten jedoch keine Abweichungen. Dies spricht für eine allgemeine Hemmung des Wachstums. Die Ausnahmen bildeten Milz, Gehirn und Körperfett der mutanten Mäuse. Milz und Gehirn wiesen bei den Mutanten ein höheres relatives Gewicht auf, während der relative Anteil des Körperfetts signifikant herabgesetzt war. Das verminderte Körpergewicht der mutanten Tiere wurde somit sowohl durch die Verringerung des Körperwachstums als auch durch die verminderte Einlagerung von Körperfett verursacht.

Um den Zusammenhang von Körpergewicht und Harnstoffkonzentration im Blut der mutanten Tiere festzustellen, wurde der Korrelationskoeffizient im Alter von 24 Wochen berechnet. Die Werte von -0,59 bei männlichen und -0,61 bei weiblichen Tieren zeigten eine negative Korrelation von Harnstoffkonzentration und Körpergewicht.

Die Messung der Blutbildparameter zeigte bei den mutanten Mäusen im fortgeschrittenen Alter einen Mangel an Erythrozyten und eine erniedrigte Hämoglobinkonzentration. Sowohl bei der Maus (GAGNON und GALLIMORE, 1988; SCHULTZE et al., 1997) als auch beim Menschen (BURGERT et al., 1975) ist eine Verringerung des Körperwachstums bei chronischer Anämie beschrieben. Die festgestellte Anämie der mutanten Tiere könnte sekundär die Verminderung des Körperwachstums manifestieren. Jedoch war sie erst im Alter von 18 Wochen nachweisbar und bezüglich der Ausprägung nur als geringgradig einzustufen. Die mutanten Mäuse zeigten eine verminderte Glukosekonzentration im Blut und nur sehr wenig Körperfett, was auf eine erhebliche Störung des Energiestoffwechsels schließen lässt. Beim Menschen wurde gezeigt, dass eine Unterversorgung mit Kohlenhydraten einen niedrigen Blutglukosespiegel zur Folge hat (BISSCHOP et al., 2001). Des weiteren könnte eine verstärkte Proteinkatabolisierung bei den mutanten Tieren zu der Verminderung des Körpergewichts beitragen. Ein stark erhöhter Eiweißabbau tritt unter anderem als Folge einer verminderten Kohlenhydratzufuhr auf und führt zu einer pathologischen Erhöhung der Harnstoffkonzentration im Blut (BISSCHOP et al., 2001; THOMAS, 2000).

Das somatische Wachstum ist vom Wachstumshormon (GH)-/Insulin like growth factor (IGF)-System abhängig (JANSSON et al., 1985). Daneben üben auch Insulin, Schilddrüsenhormone und Sexualhormone einen entscheidenden Einfluss auf das Wachstum aus (BLACKBURN, 1996). Die weitere Charakterisierung der Linie muß deshalb Hormonuntersuchungen einschließen. Die Untersuchung der Futteraufnahme ergab, dass die mutanten Mäuse absolut mehr Futter als die Wildtypiere aufnahmen. Dieses essentielle Ergebnis spricht für einen Energie- und/oder Nährstoffmangel als Folge einer möglichen Störung der Resorption bei den mutanten Mäusen. Zur Aufklärung der Störung des Energiestoffwechsels ist eine spezifische Metabolismusuntersuchung der Linie HST001 nötig.

5.3 Klinisch-chemische Parameter

Bei der Untersuchung der klinisch-chemischen Parameter ist die pathologische Erhöhung der Harnstoffkonzentration im Blut der mutanten Mäuse das Hauptsymptom dieser Tiere. Harnstoff ist das Produkt des Eiweiß- und Aminosäurestoffwechsels und wird in der Leber gebildet. Der im Körperstoffwechsel anfallende Ammoniak wird in den Mitochondrien über eine Kette von Reaktionen des Harnstoffzyklus in Harnstoff umgewandelt. Die Serumharnstoffkonzentration ist von mehreren Faktoren abhängig. Sie variiert mit dem Proteingehalt der Nahrung, dem Grad der Proteinkatabolisierung, der Größe des Glomerulumfiltrats und der aktuellen Diurese (CHEW und DIBARTOLA, 1996). Im Kindesalter besteht ein erhöhter Eiweißbedarf für das Wachstum. Die Harnstoffwerte im Blut sind deshalb niedriger als bei Erwachsenen (WITT et al., 1982). Die Harnstoffelimination erfolgt überwiegend renal durch glomeruläre Filtration. Etwa 40-60% des filtrierten Harnstoffs diffundieren unabhängig von der tubulären Flußrate im proximalen Tubulus zurück. Eine Verminderung der Harnstoffausscheidung wird bei Leber- und Nierenerkrankungen beobachtet. Bei Nierenerkrankungen führt die Hemmung der Harnstoffausscheidung zum Anstieg der Harnstoffkonzentration im Blut und zur Anämie (KOLB, 1980). Bei einer renal bedingten Harnstofferrhöhung sind bereits mehr als zwei Drittel der Nephronen geschädigt (KRAFT und DÜRR, 1981; GASCHEN, 2002).

Bei unseren mutanten Mäusen nahm die Harnstoffkonzentration mit zunehmendem Alter zu und lag im Alter von 24 Wochen mehr als doppelt so hoch wie bei den Wildtypmäusen. Bei den Wildtyptieren hingegen nahm mit zunehmendem Alter die Harnstoffkonzentration im Blut ab. Diese Ergebnisse stimmen mit den Ergebnissen von FRITH et al. (1980) überein.

Bei den mutanten Tieren ist die Ausscheidung von Harnstoff über die Nieren vermindert, da eine signifikante ($p < 0,001$) Erniedrigung der Harnstoffkonzentration im Urin der Tiere nachweisbar war. Erste histologische Untersuchungen zeigten keine lichtmikroskopisch sichtbaren Veränderungen der Nieren bei mutanten Tieren, die die pathologische Erhöhung der Harnstoffkonzentration im Blut und die herabgesetzte Harnstoffausscheidung im Harn erklären könnten. Zudem war bei den mutanten Tieren keine Erhöhung der Kreatininkonzentration im Blut nachweisbar. Kreatinin ist ein Produkt des endogenen Muskelstoffwechsels. Es wird glomerulär filtriert und nur in geringem Maße tubulär sezerniert. Dadurch steht die Kreatininkonzentration im Serum in engem Zusammenhang mit der glomerulären Filtrationsrate (SPIEGEL und MOLITORIS, 1996; LEVAY et al., 1998).

Im Gegensatz zum Harnstoff besteht für die Serum-Kreatininkonzentration keine Nahrungsabhängigkeit (KRAFT und DÜRR, 1981; EVERETT und HARRISON, 1983; RODGER et al., 1985). Das Serumkreatinin ist erhöht, wenn über 70% der Nierenmasse nicht funktionstüchtig sind (GASCHEN, 2002). Die Tatsache, dass die Kreatininkonzentration bei mutanten und Wildtyptieren nicht signifikant unterschiedlich war, spricht gegen das Vorliegen einer allgemeinen Störung der glomerulären Filtration. Eher ist das Vorliegen eines Defekts der Nierenfunktion auf molekularer Ebene anzunehmen, der speziell die Harnstoffausscheidung beeinträchtigt. Ein vergleichbarer erblicher Phänotyp wurde auch beim Menschen beschrieben (HSU et al., 1978). Ein Beispiel für die selektive Störung der Harnstoffausscheidung stellen Mäuse mit funktioneller Ausschaltung des Harnstofftransportermoleküls B (urea transporter B, UT-B) dar. In diesen UT-B-Knockout-Mäusen liegt eine Störung der Harnkonzentrationsfähigkeit vor, die zu einer verminderten Harnstoffausscheidung und zu einem Anstieg der Harnstoffkonzentration im Serum führt (YANG et al., 2002). In dieser Hinsicht zeigt die UT-B-Knockout-Maus einen dem der HST001-Maus vergleichbaren Phänotyp. Dieser tritt aber, im Gegensatz zum HST001-Phänotyp, der dominant vererbt wird, nur bei homozygoten Knockout-Tieren auf. Zudem ist das UT-B Gen der Maus auf Chromosom 18 lokalisiert (SANDS, 2002), während die Mutation der Mauslinie HST001 auf Chromosom 7 lokalisiert wurde. Eine Reihe von funktionellen Untersuchungen zum Urinkonzentrationsmechanismus der Nieren haben jedoch gezeigt, dass neben den bereits bekannten Harnstofftransportern UT-A und UT-B mit ihren diversen Isoformen weitere aktive Natrium-Harnstoff-Antiporter existieren müssen, die sowohl zur Reabsorption als auch zur Sekretion von Harnstoff in der Niere beitragen (KATO und SANDS, 1998a; KATO und SANDS, 1998b). Eine Störung der Funktion dieser auf molekularer und genetischer Ebene noch nicht identifizierten Transporter könnte ebenfalls eine verminderte Harnstoffausscheidung zur Folge haben.

Zum anderen könnte ein vermehrter Proteinabbau zur Erhöhung der Harnstoffkonzentration im Blut beitragen (siehe 5.2). Die Abklärung der Proteinkatabolisierung bedarf jedoch weiterführende Untersuchungen.

Das Gesamtprotein im Serum setzt sich aus zwei Hauptgruppen von Proteinen, den Albuminen und Globulinen (α -, β -, und γ -Globuline), zusammen. Die Serumalbumine machen dabei 55-60% der Gesamtproteinkonzentration aus. Die Serumproteine werden hauptsächlich in der Leber produziert. Sie dienen im Serum vornehmlich als Regulatoren des intravasalen onkotischen Drucks und als Transportvehikel für wasserunlösliche Stoffe (BLACKBURN, 1996). Bei C57BL/6 und BALB/c-Mäusen nimmt die Gesamtproteinkonzentration im Blut mit zunehmendem Alter leicht zu (FRITH et al., 1980). Desweiteren wurde eine leichte Zunahme bei männlichen BALB/cBy-Tieren und C3B6F1-Hybriden sowie eine Abnahme der Gesamtproteinkonzentration bei weiblichen DBA/2-Mäusen mit zunehmendem Alter beobachtet (LOEB et al., 1996). Bei unseren mutanten Mäusen wurden signifikant ($p < 0,05$) erhöhte Werte gegenüber den Wildtyptieren gemessen. Die männlichen Tiere beider Gruppen wiesen auch eine signifikant höhere Gesamtproteinkonzentration als die weiblichen Tiere auf, wobei das Alter keinen Einfluss hatte. Die Ursache, die zu der Erhöhung der Gesamtprotein-konzentration im Blut der mutanten Mäuse führte, konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht ermittelt werden.

Die mutanten Mäuse wiesen im Alter von 18 und 24 Wochen signifikant ($p < 0,01$) niedrigere Glukosekonzentrationen im Plasma als die Wildtypmäuse auf, obwohl sie absolut mehr Futter aufnahmen. Hingegen ist eine Urämie bei Hund und Katze in der Regel mit einer Hyperglykämie verbunden (GASCHEN, 2002). Bei Untersuchungen mutanter Tiere als auch bei Wildtypmäusen wurde eine Abnahme der Glukosekonzentration im Blut mit zunehmendem Alter beobachtet. Eine vergleichbare Entwicklung des Blutglukosespiegels wurde auch in früheren Studien beobachtet (FRITH et al., 1980; LOEB et al., 1996; WOLFORD et al., 1986; LOEB, 1997). Die Abnahme der Glukosekonzentration im Blut der Mäuse mit zunehmendem Alter ist durch eine Vergrößerung der Langerhanschen Inseln des Pankreas und eine Erhöhung der Insulinkonzentration bedingt (LEITER et al., 1988). Die Ursache für die abnorme Glukosekonzentration bei den Mutanten ist noch nicht geklärt, da weder die Untersuchung des Pankreas (Gewicht und Histologie), noch die Bestimmung der Glukosekonzentration im Harn einen Hinweis auf die mögliche Ursache lieferten.

Amylase wird in den Speicheldrüsen (Amylase 1) und im Pankreas (Amylase 2) gebildet (MEISLER et al., 1983), wobei Amylase 1 im Blut überwiegt, da Amylase 2 sehr schnell über die Nieren eliminiert wird (MacKENZIE und MESSER, 1976). Die Konzentration von Amylase im Blut war bei den mutanten Mäusen im Alter von 18 und 24 Wochen signifikant ($p < 0,05$) niedriger als bei den Wildtypmäusen. Das Speicheldrüsen- und Pankreasgewicht der Mäuse beider Gruppen unterschied sich nicht voneinander und auch die histologische Untersuchung des Pankreas mutanter Tiere ergab keine sichtbaren Veränderungen.

Bei den mutanten Tieren zeigten sich signifikant niedrigere Triglyceridwerte als bei den Wildtypmäusen, während sich hinsichtlich des Cholesterinspiegels keine signifikanten Unterschiede ergaben. Im Gegensatz dazu führt ein urämisches Syndrom bei Hund und Katze zu einer Hypertriglyceridämie (GASCHEN, 2002). Die männlichen Tiere beider Gruppen wiesen höhere Konzentration von Triglyceriden als die weiblichen Tiere auf. Diese Ergebnisse stimmen mit publizierten Werten aus Untersuchungen an Inzuchtmäusen, Hybriden und Auszuchtmäusen überein (WOLFORD et al., 1986; LEVINE, 1995; WALTER, 1999). Im Rahmen dieser Arbeit konnte kein Einfluss des Alters auf die Triglyceridkonzentration im Blut der Mäuse nachgewiesen werden. Dies steht im Widerspruch zu den Ergebnissen früherer Untersuchungen, die bei Inzuchtmäusen, Hybriden und Auszuchtmäusen mit zunehmendem Alter abnehmende Triglyceridkonzentrationen im Blut gemessen haben (LOEB et al., 1996; WOLFORD et al., 1986; LEVINE, 1995).

Bei den mutanten Tieren war die mittlere Alkalische Phosphatase-Aktivität höher als bei den Wildtyptieren. Sie lag jedoch noch innerhalb des normalen Streubereichs für C3H-Stammzuchttiere im Alter von 12 Wochen (eigene unpublizierte Daten). Die alkalische Phosphatase-Aktivität nahm mit zunehmendem Alter ab. Ein solches Ergebnis wurde von FRITH et al. (1980) und LOEB et al. (1996) auch bei BALB/c- und C57BL6-Mäusen festgestellt.

5.4 Blutbildparameter

Bei der Untersuchung der Blutbildparameter zeigten die Mutanten im Alter von 18 und 24 Wochen eine signifikant niedrigere Anzahl der roten Blutkörperchen als Wildtypiere. Die Anzahl der roten Blutkörperchen der mutanten Mäuse korrelierte linear und negativ zur Harnstoffkonzentration. Im Alter von 18 Wochen lag der Korrelationskoeffizient von Harnstoffkonzentration und Anzahl der roten Blutkörperchen bei $-0,55$ und im Alter von 24 Wochen bei $-0,65$. Ursache für die Verminderung der Anzahl der roten Blutkörperchen bei den mutanten Mäusen könnten eine Störung der Bildung der roten Blutkörperchen und/oder eine Verkürzung ihrer Lebensdauer sein. Letzteres ist im vorliegenden Fall als die wahrscheinlichere Ursache anzusehen, da nachgewiesen wurde, dass die Lebensdauer der roten Blutkörperchen unter Einwirkung von harnpflichtigen Substanzen verkürzt ist (TOEPFER, 2001). Gleichzeitig ergaben sich Hinweise, dass auch die Blutbildung bei den mutanten Tieren gestört ist, da auch das MCV, die Hämoglobinkonzentration und der Hämatokritwert bei diesen Tieren herabgesetzt ist. Insofern gleicht das Blutbild dem Befund bei einer leichten Eisenmangelanämie (ANDREWS, 1999). Die Ermittlung der genauen Ursache bedarf weiterer Untersuchungen.

5.5 Kartierung der Mutation

Die Kartierung der Mutation in der Linie HST001 wurde anhand von phänotypisch bestimmten Nachkommen der Anpaarung von heterozygot mutanten C3B6F1-Hybriden mit C57BL/6-Mäusen durchgeführt. Das Auftreten von Mäusen, die anhand der Blutharnstoffkonzentration nicht eindeutig einer der beiden Gruppen der Mutanten und der Wildtypwurfgeschwister zugeordnet werden konnten, wurde dem genetisch heterogenen Hintergrund der Rückkreuzungsnachkommen zugeschrieben, da C57BL/6-Mäuse einen höheren Harnstoffspiegel als C3H-Mäuse aufweisen (eigene unveröffentlichte Daten). Tiere mit fraglichem Phänotyp wurden nicht für die nachfolgenden Untersuchungen verwendet.

Zur Grobkartierung der Mutation in der Linie HST001 wurden die DNA-Proben von 36 mutanten Tieren und 32 Wildtypen analysiert. Die Analyse der gepoolten Proben sowie der Einzelproben zeigte eine deutliche Kopplung der Mutation mit den genetischen Markern des Chromosoms 7. Die stärkste Kopplung ergab sich für den Marker D7Mit238. Demzufolge ist davon auszugehen, dass die Mutation in Nachbarschaft zu diesem Marker liegt. Die Ergebnisse von zwei Mutanten (36557, 33061) und vier Wildtypen (32462, 34811, 37667, 32664) passen nicht ins Bild. Mögliche Ursachen dafür sind das Vorliegen eines Doppel-Crossingover, eine fehlerhafte Phänotypisierung oder Fehler bei der Zuordnung der Proben. Die anschließende Feinkartierung der Mutation ist mit zusätzlichen genetischen Markern der bestimmten chromosomalen Region an einer erhöhten Anzahl von Tieren durchzuführen. Danach kann die Identifizierung der Mutation durch Sequenzierung von Kandidatengenen, die nach Lokalisation im Genom und eventuell schon beschriebener Funktion ausgewählt werden, im Genom der mutanten Tiere durchgeführt werden. Alternativ ist eine RNA-Expressionsanalyse aller in der Umgebung der kartierten Mutation lokalisierten Gene durchzuführen.

6 Zusammenfassung

Im Rahmen des Münchener ENU-Maus-Mutagenese-Projekts wurde eine dominante Mutation in C3H-Mäusen identifiziert, die zu einer pathologischen Erhöhung der Harnstoffkonzentration im Blut führt. Daraus wurde die mutante Mauslinie HST001 etabliert. Zur Charakterisierung des Phänotyps wurde an heterozygoten Mutanten eine systematische Untersuchung der Körpergewichtsentwicklung, Futteraufnahme, zahlreicher klinisch-chemischer und hämatologischer Parameter, der absoluten und relativen Organgewichte sowie der Histologie der inneren Organe durchgeführt. Dafür wurden heterozygote Mutanten mit C3H-Mäusen verpaart und die Nachkommen anhand der Höhe der Harnstoffkonzentration im Blut in die beiden Gruppen der Mutanten und der Wildtypwurfgeschwister aufgeteilt. Die Mutation zeigte in allen untersuchten Generationen eine vollständige phänotypische Penetranz. Parallel erfolgte die Kartierung der Mutation im Genom.

Im Alter von 4 Wochen zeigte sich kein Unterschied im Körpergewicht der mutanten Mäuse und der Wildtyptiere. Ab der 6. Woche nahmen die mutanten Tiere langsamer als die Wildtypwurfgeschwister zu. Von diesem Zeitpunkt an war das Körpergewicht der mutanten Mäuse signifikant niedriger. Im Alter von 26 Wochen waren die mutanten Mäuse ca. 20% leichter, obwohl die absolute Futteraufnahme höher als bei den Wildtyptieren war. Außerdem zeigten die Mutanten eine geringere Nasen-Rumpf-Länge und ein niedrigeres relatives abdominales Fettgewicht als die Wildtyptiere. Hinsichtlich der relativen Organgewichte wiesen die mutanten Tiere ein signifikant höheres Milz- und Gehirngewicht auf.

Die Untersuchung der klinisch-chemischen Parameter und der Blutbildparameter wurde als Verlaufsanalyse im Alter von 12, 18 und 24 Wochen durchgeführt. Dabei wiesen die mutanten Tiere signifikant höhere Werte für Harnstoff, Gesamtprotein und alkalische Phosphatase-Aktivität und signifikant niedrige Werte für Triglyceride, Glukose und Amylase-Aktivität im Blut auf. Die Harnstoffkonzentration nahm bei den Mutanten mit zunehmendem Alter zu, wohingegen sie bei den Wildtyptieren abnahm. Im Alter von 24 Wochen lag sie bei den Mutanten mehr als doppelt so hoch wie bei den Kontrollen. Die histologische Untersuchung der Nieren ergab keine offensichtlichen Befunde, die die pathologische Erhöhung der Harnstoffkonzentration im Blut der mutanten Mäuse erklärten. Dennoch war die Harnstoffausscheidung über die Nieren gestört, was sich in einer signifikant niedrigeren Harnstoffkonzentration im Urin der mutanten Mäuse im Vergleich zu den Wildtyptieren zeigte. Die Bestimmung der Blutbildparameter ergab, dass die Mutanten im Alter von 18

und 24 Wochen signifikant niedrigere Werte für rote Blutkörperchen, Hämoglobin, Hämatokrit und mittleres korpuskuläres Volumen aufwiesen als die Wildtyptiere.

Das bisherige Ergebnis der Kartierung der kausalen Mutation im Genom mit Hilfe von polymorphen Mikrosatellitenmarkern ergab die Lokalisation der Mutation auf Chromosom 7. Dieses Ergebnis ist mit Hilfe von weiteren Markern an einer größeren Anzahl von Tieren abzusichern und zu präzisieren.

6 Summary

Phenotypic and genotypic characterization of the ENU-induced mutant mouse line HST001 for use in nephrological research

A dominant mutation was established in the line HST001 within the Munich ENU mouse mutagenesis project. On the genetic background of the inbred strain C3H heterozygous mutant mice showed a pathological increase of the plasma urea concentration. The phenotypic characterization of the mutant line included the measurement of body and organ weights, food intake and a broad spectrum of clinical chemical and hematological parameters as well as histological investigations of inner organs. For those examinations heterozygous mutant mice were mated to C3H mice and the offspring were divided in the two groups of mutant and wildtype littermates according to the concentration of plasma urea. The mutation showed complete phenotypic penetrance in all generations examined. In addition the genomic localization of the causative mutation was determined by linkage analysis.

At the age of 4 weeks the body weight of the mutant mice and the wildtype mice showed no difference. After 6 weeks the mutant mice grew more slowly leading to a significantly lower body weight compared to the wildtype littermates. At the age of 26 weeks the body weight of mutant mice was about 20% reduced as compared to controls. Mutants also showed a reduction of the nose-rump-length and the body fat content. Regarding the relative organ weights the mutant mice showed significantly higher values for the spleen and the brain.

The clinical-chemical and hematological parameters were determined in the animals at the age of 12, 18 and 24 weeks. The mutant mice had significantly higher plasma concentrations of urea and total protein as well as a higher activity of the alkaline phosphatase. Beside that they showed lower plasma concentrations of triglycerides and glucose and a lower activity of amylase than the wildtype mice. The mutants showed increasing plasma urea levels whereas the levels decreased in the controls. At the age of 24 weeks the mutants showed levels, which were two-fold higher than those of the controls. The histopathological investigation of the kidneys did not reveal any alterations, which could to explain the pathological increase of the plasma urea concentration in the mutant mice. However urea secretion via the kidneys was impaired, since the mutants showed significantly lower urine urea levels compared to the wildtype mice. The investigation of the hematological parameters resulted in the occurrence of altered values in the 18 und 24 weeks old mice. The mutant mice showed reduced numbers

of erythrocytes as well as decreased values for hemoglobin concentration, mean corpuscular volume and hematocrit.

The hitherto existing results of the linkage analysis of the mutation in the genome using polymorphic microsatellite markers showed that the mutation maps to chromosome 7. This result has to be confirmed and specified by using additional markers and a larger number of animals.

8 Literaturverzeichnis

- ANDERS, H.J. and SCHLÖNDORFF, D. (2000): Murine models of renal disease: possibilities and problems in studies using mutant mice. *Exp. Nephron* 8, 181-193
- ANDREWS, N.C. (1999): Disorders of iron metabolism. *New Eng. J. Med.* 341, 1986-1995
- ASHBURNER, M. (1989): *Drosophila - a laboratory handbook*, pp. 343-403. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY
- BISSCHOP, P.H., SAUERWEIN, P., ENDERT, E. and ROMIJN, J.A. (2001): Isocaloric carbohydrate deprivation induces protein catabolism despite in low T3-syndrome in healthy men. *Clin. Endocrinol.* 54, 75-80
- BLACKBURN, A. (1996): Effekte und Interaktionen von Wachstumshormon (GH) und insulin-like growth factor-II (IGF II) in transgenen Mäusen. Dissertation zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde der Tierärztlichen Fakultät der Universität München
- BOYD, J.W. (1988): Serum enzymes in the diagnosis of disease in man and animals. *J. Comp. Pathol.* 98, 381-404
- BROWN, S. (1998): Mouse models of genetic disease: New approaches, new paradigms. *J. Inher. Metab. Dis.* 21, 532-539
- BROWN, S. and PETERS, J. (1996): Combining mutagenesis and genomics in the mouse: closing the phenotype gap. *Trends Genet.* 12, 433-435
- BUDAVARI, S. (1989): *The Merck Index: An encyclopedia of chemicals, drugs and biologicals*, pp 603. Merck, Rahway, N.J.
- CHAI, C.K. (1978): Spontaneous amyloidosis in LLC mice. *Am. J. Pathol.* 90, 381-398
- CHARLES, D.J. and PRETSCH, W. (1987): Linear dose-response relationship of erythrocyte enzyme-activity mutations in offspring of ethylnitrosourea-treated mice. *Mutat. Res.* 176, 81-91
- CHEW, D.J. und DIBARTOLA, S.P. (1994): Niereninsuffizienz. In: Fenner, W.R. (Ed.): *Kleintierkrankheiten, Differentialdiagnostik und Therapie in der Praxis*. G. Fischer Verlag, Jena
- CHEW, D.J. and DIBARTOLA, S.P. (1996): Diagnosis and pathophysiology of renal disease. In: Ettinger, S.J. (Ed.): *Textbook of veterinary internal medicine*, pp. 1893-1961. W.B Saunders, Philadelphia

EVANS, M.J., CARLTON, M.B.L. and RUSS, A.P. (1997): Gene trapping and functional genomics. *Trends Genet.* 13, 370-374

FLOEGE, J. (2003): Prävention und Verhinderung des fortschreitenden Nierenfunktionsverlustes ([http://www.nephrologie.de/164 Praevention.htm](http://www.nephrologie.de/164_Praevention.htm))

FOREMAN, J.W. and CHAN, J.C.M. (1988): Chronic renal failure in infants and children. *J. Pediatr.* 113, 793-800

FRITH, C.H., SUBER, R.L. and UMHOLTZ, R. (1980): Hematologic and clinical chemistry findings in control BALB/c and C57BL/6 mice. *Lab. Anim. Sci.* 30, 835-840

GAGNON, R.F. and GALLIMORE, B. (1988): Characterization of a mouse model of chronic Uremia. *Urol. Res.* 16, 119-126

GASCHEN, F. (2002): Propädeutik der Nieren und der Harnwege. (<http://www.nephrologie.de>)

GEIGER, H., JONAS, D., LENZ, T. and KRAMER, W. (2002): Nierenerkrankungen. Pathophysiologie, Diagnostik und Therapie. Schattauer Verlag, Stuttgart

HARBACH, P.R., FILIPUNAS, A.N., WANG, Y. and ARON, C.S. (1992): DNA sequence analysis of spontaneous and N-ethyl-N-nitrosourea-induced hprt mutations arising in vivo in cynomolgus monkey T-lymphocytes. *Environ. Mol. Mutagen.* 20, 96-105

HOLZNER, D. (1995): Chemie für Technische Assistenten in der Medizin und in der Biologie. Wiley-VCH, Weinheim

HSU, C.H., KURTZ, T.W., MASSARI, P.U., PONZE, S.A. and CHANG, B.S. (1978): Familial azotemia: impaired urea excretion despite normal renal function. *New Eng. J. Med.* 298, 117-121

IARC (1972): Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Human, Vol. 1, pp. 135-140. International Agency for Research on Cancer, Lyon

JANSSON, J.O., EDEN, S. and ISAKSSON, O. (1985): Sexual dimorphism in the control of growth hormone secretion. *Endocr. Rev.* 6, 128-150

JUSTICE, M.J. (1999): Mutagenesis of the mouse germline. In: Jackson, I. and Abbott, C. (Eds.): *Mouse genetics and transgenics: A Practical Approach*. Oxford University Press, New York

KATO, A. and SANDS, J.M. (1998a): Active sodium-urea counter-transport is inducible in the basolateral membrane of rat renal initial inner medullary collecting ducts. *J. Clin. Invest.* 102, 1008-1015

KATO, A. and SANDS, J.M. (1998b): Evidence for sodium-dependent active urea secretion in the deepest subsegment of the rat inner medullary collecting duct. *J. Clin. Invest.* 101, 423-428

- KOLB, E.(1980): Lehrbuch der Physiologie der Haustiere. G. Fischer Verlag, Jena
- KRAFT, W. und DÜRR, U.M. (1981): Kompendium der Klinischen Laboratoriumsdiagnostik bei Hund, Katze, Pferd. M.&H. Schaper, Hannover
- KRAFT, H. und SCHILLINGER, D. (1989): Klinische Labormethoden der Veterinärmedizin bei Haustieren. F. Enke Verlag, Stuttgart
- LEITER, E.H., PREMDAS, F., HARRISON, D.E. and LIPSON, L.G. (1988): Aging and glucose homeostasis in C57BL/6J male mice. *FASEB J.* 2, 2807-2811
- LEVAY, A.S., PERONNE, R.D. and MADIAS, N.E. (1998): Serum creatinin and renal function. *Annu. Rev. Med.* 39, 465-490
- LEVINE, B.S. (1995): Animal clinical pathology. In: Derelanko, M.J. and Hollinger, M.A. (Eds.): *CRC handbook of toxicology*, pp. 517-537. CRC Press, Boca Raton, FL
- LEWIS, S.E., BARNETT, L.B., SADLER, B.M. and SHELBY, M.D. (1991): ENU mutagenesis in the mouse electrophoretic specific-locus test. 1. Dose-response relationship of electrophoretically-detected mutations arising from mouse spermatogonia treated with ethylnitrosourea. *Mutat. Res.* 249, 311-315
- LOEB, W.F. (1997): Clinical biochemistry of laboratory rodents and rabbits. In: Kaneco, J.J., Harvay, J.W. and Brass, M.L. (Eds.): *Clinical Biochemistry of Domestic Animals*, pp. 845-899. Academic Press, San Diego
- LOEB, W.F., DASS, S.R., HARBUOR, L.S., TURTORRE, A., BUCCI, T.J., and CLIFFORD, C.B. (1996): Clinical biochemistry. In: Mohr, U., Dungworth, D.L., Capan, C.C., Carlton, W.W., Sundberg, J.P. and Ward, J.M. (Eds.): *Pathobiology of the aging mouse*, pp.3-19. ILSI Press, Washington D.C.
- LÖFFLER, G. und PETRIDES, P.E. (2002): *Biochemie und Pathobiochemie*. Springer Verlag, Berlin
- MacKENZIE, P.I. and MESSER, M. (1976): Studies on the origin and excretion of serum alpha-amylase in the mouse. *Comp. Biochem. Phys. B* 54, 103-106
- MARK, D.A., ALONSO, D.R., QUIMBY, F., THALER, T., KIM, Y.T., FERNANDES, G., GOOD, R.A. and WEKSLER, M.E. (1984): Effects of nutrition on disease and life span. I. Immune responses, cardiovascular pathology, and life span in MRL mice. *Am. J. Pathol.* 117, 110-124
- MEISLER, M., STRAHLER, J., WIEBAUER, K. and THOMSEN, K.K. (1983): Multiple genes encode mouse pancreatic amylases. *Curr. Top. Biol. Med. Res.* 7, 38-57
- MORGAN, D.B., CARVER, M.E. and PAYNE, R.B. (1977): Plasma creatinine and urea creatinine ratio in patients with raised plasma urea. *Brit. Med. J.* 2, 929

- MORIMOTO, K., YAMAHA, T., NAKADATE, M. and SUZUKI, I. (1978): Chemical stability, alkylating activity, and lipophilicity of 1-ethylene-bis(1-nitrosourea) and related compounds. *Ganne*, 69, 139-142
- NAGAO, S., WATANABE, T., OGISO, N., MARUNOUCHI, T. and TAKAHASHI, H. (1995): Genetic mapping of the polycystic kidney gene, *pcy*, on mouse chromosome 9. *Biochem. Genet.*, 33, 401-412
- NOVEROSKE, J.K., WEBER, J.S. and JUSTICE, M.J. (2000): The mutagenic action of N-ethyl-N-nitrosourea in the mouse. *Mamm. Genome* 11, 478-483
- NÜSSLEIN-VOLLHARD, C. and WIESCHAUS, E. (1980): Mutations affecting segment number and polarity in *Drosophila*. *Nature* 287, 795-801
- POPESKO, P., RAITOVA, V. and HORAK, J. (1982): A colour atlas of anatomy of small laboratory animals. Vol. 2: Rat-Mouse-Hamster. Wolf Publishing, London
- POPP, R.A., BAILIFF, E.G., SKOW, L.C., JOHNSON, F. M. and LEWIS, S.E. (1983): Analysis of a mouse alpha-globin gene mutation induced by ethylnitrosourea. *Genetics* 105, 157-167
- PSCHYREMBEL (1998): *Klinisches Wörterbuch*. Walter de Gruyter, Berlin
- RAMIREZ-SOLIS, R., DAVIS, A.C. and BRADLEY, A. (1993): Gene targeting in embryonic stem cells. *Method Enzymol.* 225, 855-878
- RATHKOLB, B., DECKER, T., FUCHS, E., SOEWARTO, D., FELLA, Ch., HEFFNER, S., PARGENT, W., WANKE, R.; BALLING, R., HRABE DE ANGELIS, M., KOLB, H.J. and WOLF, E. (2000a): The clinical-chemical screen in the Munich ENU mouse mutagenesis project: screening for clinical relevant phenotypes. *Mamm. Genome* 11, 543-546
- RATHKOLB, B., FUCHS, E., KOLB, H. J., RENNER-MÜLLER, I., KREBS, O., BALLING, R. and HRABE DE ANGELIS, M. (2000b): Large scale N-ethyl-N-nitrosourea mutagenesis of mice: from phenotypes to genes. *Exp. Physiol.* 85, 635-644
- RATHKOLB, B., KREBS, O., BALLING, R., HRABE DE ANGELIS, M. and WOLF, E. (1999): Discovery and functional characterization of new genes by large scale ENU mutagenesis in mice. *Arch. Tierz.* 42, 74-85
- REUTER, P. (2000): *Wörterbuch der Medizin*. Springer Verlag, Berlin
- RODGER, S.C., LAKER, M. F. and FLECHER, K. (1985): Factors influencing normal reference intervals for creatinine, urea, and electrolytes in plasma as measured with a Beckmann Astra 8 analyzer. *Clin. Chem.* 31, 292-295
- RUSS, A., STUMM, G., AUGUSTIN, M., SEDLMEIER, R., WATTLER, S. and NEHLS, M. (2002): Random mutagenesis in the mouse as a tool in drug discovery. *Drug Discov. Today* 7, 1175-1183

- RUSSEL, W.L., HUNSICKER, P.R., RAYMER, G.D., STEELE, M.H., STELZNER, K.F. and THOMPSON, H.M. (1982): Dose-response curve for ethylnitrosourea-induced specific-locus mutations in mouse spermatogonia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79, 3589-3591
- RUSSEL, W.L., KELLY, E.M., HUNSICKER, P.R., BANGHAM, J.W., MADDUX, S.C. and PHIPPS, E.L. (1979): Specific-locus test shows ethylnitrosourea to be the most potent mutagen in the mouse. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76, 5818-5819
- SABORIO, P. and SCHEINMAN, J. (1998): Genetic renal disease. *Curr. Opin. Pediatr.* 70, 174-183
- SACHS, L. (2003): *Angewandte Statistik*. Springer Verlag, Berlin
- SANDS, J.M. (2002): Molecular mechanisms of urea transport. *J. Membrane Biol.* 191, 149-163
- SCHEUNERT, A. und TRAUTMANN, A. (1987): *Lehrbuch der Veterinär-Physiologie*. Verlag P. Parey, Berlin
- SCHMIDL, M. (1978): *Laboruntersuchungen für die Diagnose und Verlaufkontrolle*. Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim
- SCHMIDT, R.F. und THEWS, G. (1993): *Physiologie des Menschen*. Springer Verlag, Berlin
- SCHULTZE, A.E., SCHAEFFER, D.O., POTTER, M.D. and JOHNSON, D.K. (1997): Alterations in growth, haematopoiesis and serum chemistry profiles in fitness 1 (4226SB) mutant mice. *Comp. Haematol.* 7, 143-151
- SCHWARTZ, G.J., HAYCOCK, G.B., CHIR, B. and SPITZER, A. (1976): Plasma creatinine and urea concentration in children: normal values for age and sex. *J. Pediatr.* 88, 828-830
- SELMA, M. (1999): Anämie. (<http://www.medizin-netz.de/icenter/anaemieumfass.htm>)
- SHIBUYA, T. and MORIMOTO, K. (1993): A review of the genotoxicity of 1-ethyl-1-nitrosourea. *Mutat. Res.*, 297, 3-38
- SILVER, M.L. (1995): *Mouse genetics: concepts and applications*. Oxford University Press, New York
- SINGER, B. and DOJAHJH, M.K. (1990): Site-directed mutagenesis for quantitation of base-base interactions at defined sites. *Mutat. Res.* 233, 45-51
- SOEWARTO, D., FELLA, C., TEUBNER, A., RATHKOLB, B., PARGENT, W., HEFFNER, S., MARSCHALL, S., WOLF, E., BALLING, R. and HRABE DE ANGELIS, M. (2000): The large scale Munich ENU-mouse-mutagenesis screen. *Mamm. Genome* 11, 507-510

SPIEGEL, D.M. and MOLITORIS, B.A. (1996): Textbook of internal medicine, pp. 825-832. J.B. Lippincott, London

STANFORD, W.L, COHN, J.B. and CORDES, S.P (2001): Gene-trap mutagenesis: past, present and beyond. *Nat. Rev. Genet.* 2, 756-768

STRYER, L. (1996): Biochemie. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg

THOMAS, L. (2000): Labor und Diagnose. TH-Books, Frankfurt/Main

THOMAS, K.R. and CAPECCHI, M.R. (1987): Site-directed mutagenesis by gene targeting in mouse embryo-derived stem cells. *Cell* 51, 503-512

TOEPFER, M. (2001): Renale Anämie. ([http://www.netdokter.de/krankheiten/fakta/renale anämie.htm](http://www.netdokter.de/krankheiten/fakta/renale_anämie.htm))

UEYAMA, Y., KUWAHARA, Y., TAKAHASHI, H., MARUO, K., HIOKI, K., SAITO, M., ESAKI, K., NOMURA, T. and TAMAOKI, N. (1984): Usefulness of double-mutant athymic/renal failure mice in experimental therapy of nephrogenic anemia by an erythropoietin-producing human tumor. In: B. Sordat (Ed.): *Immune-Deficient Animals*, pp.73-75. Karger, Basel

WALTER, F., LOEB, V., FRED, W. and QUIMBY, V. (1999): The clinical chemistry of laboratory animals. Edwards Brothers, Ann Arbor, MI

WILES, M.V., VAUTI, F., OTTE, J., FUCHTBAUER, E.M., RUIZ, P., FUCHTBAUER, A., ARNOLD, H.H., LEHRACH, H.; METZ, T., VON MELCHNER, H. and WURST, W. (2000): Establishment of a gene-trap sequence tag library to generate mutant mice from embryonic stem cells. *Nat. Genet.* 24, 13-14

WITTKE, G. (1987): Lehrbuch der Veterinär-Physiologie. Verlag P. Parey, Berlin

WITT, J. und TRENDELENBURG, CHR. (1982): Gemeinsame Studie zur Erstellung von Richtwerten für klinisch-chemische Kerngrößen im Kinderalter. *Clin. Chem. Clin. Biochem.* 20, 235

WOLFORD, S.T., SCHROER, R.A., GOHS, F.X., GALLO, P.P., BRODECK, M., FALK, H.B. and RUBREN, R. (1986): Reference range data base for serum chemistry and hematology values in laboratory animals. *J. Toxicol. Env. Health* 18, 161-188

YANG, B., BANKIR, L., GILLESPIE, A., EPSTEIN, C.J. and VERKMAN, A.S. (2002): Urea-selective concentrating defect in transgenic mice lacking urea transporter UT-B. *J. Biol. Chem.* 277, 10633-10637

9 Anhang

Liste der verwendeten Mikrosatellitenmarker

PCR-Fragment-Länge (bp)								
	Chromosom	Marker		Locus (cM)	C3H/HeJ	C57BL/6J	DBA/2J	BALB/cJ
1	1	1	294	8.3	156	150	156	212
2	1	1	213	25.7	96	108	96	108
3	1	1	46	43.1	276	256	264	256
4	1	1	139	65.0	230	242	230	230
5	1	1	17	106.3	183	170	174	176
6	2	2	5	5.0	137	140	137	140
7	2	2	7	28.0	142	147	142	147
8	2	2	13	50.3	180	190	192	192
9	2	2	395	66.9	122	128	134	134
10	2	2	200	107.0	114	136	114	136
11	3	3	130	3.9	121	149	161	121
12	3	3	331	16.5	108	116	116	116
13	3	3	278	33.7	112	116	112	92
14	3	3	75	49.0	98	110	112	98
15	3	3	256	66.2	124	128	124	124
16	3	3	128	83.5	159	151	161	159
17	4	4	235	1.9	90	116	90	90
18	4	4	238	17.9	118	112	118	118
19	4	4	89	19.8	118	132	118	118
20	4	4	27	42.5	118	150	152	118
21	4	4	42	81.0	94	102	91	102
22	5	5	103	5.0	314	306	310	314
23	5	5	267	24.0	154	148	156	156
24	5	5	113	42.0	104	98	98	104
25	5	5	117	61.0	321	327	327	323
26	5	5	101	81.0	118	130	130	118
27	6	6	236	3.1	134	144	146	134
28	6	6	33	25.5	146	140	146	140
29	6	6	248	37.0	144	138	144	138
30	6	6	366	50.5	142	124	128	124
31	6	6	200	71.6	102	108	102	108
32	7	7	340	1.2	128	112	128	140
33	7	7	270	18.0	122	146	136	122
34	7	7	31	44.0	226	246	224	230
35	7	7	284	57.5				
36	7	7	189	72.4	120	144	120	122
37	8	8	124	6.2	135	129	135	135
38	8	8	125	19.5	145	133	145	145
39	8	8	41	41.0	160	150	160	154
40	8	8	166	56.0	126	122	126	138
41	8	8	93	72.0	170	168	168	170
42	9	9	90	9.0	143	145	159	143
43	9	9	286	23.0	92	108	100	92

44	9	9	306	42.0	116	106	116	116
45	9	9	115	56.0	137	145	137	137
46	9	9	281	68.0	115	121	121	115
47	10	10	152	4.0	148	154	140	148
48	10	10	214	19.0	132	126	126	132
49	10	10	31	36.0	154	152	152	154
50	10	10	10	51.0	128	180	128	128
51	10	10	68	51.5	94	108	94	94
52	10	10	180	64.0	206	134	156	156
53	10	10	179	64.0	164	152	162	162
54	11	11	62	1.5	160	148		160
55	11	11	206	20.0	157	143	153	157
56	11	11	194	44.0	128	134	128	128
57	11	11	199	62.0	156	144	156	144
58	11	11	48	77.0	130	136	130	136
59	12	12	38	1.0	148	142	148	148
60	12	12	60	16.0	138	144	124	138
61	12	12	14	37.0	146	130	146	146
62	12	12	79	53.0	132	154	130	154
63	13	13	217	7.0	110	116	110	104
64	13	13	59	16.0	220	204		220
65	13	13	117	19.0	126	120	120	126
66	13	13	139	32.0	145	139	149	145
67	13	13	148	59.0	117	137	117	117
68	13	13	35	75.0	182	190	182	190
69	14	14	99	1.0	106	124	106	124
70	14	14	233	19.5	184	200	192	184
71	14	14	215	22.5	132	126	132	126
72	15	15	179	10.8	152	148	152	152
73	15	15	128	26.2	146	136	136	136
74	15	15	259	46.7	86	82	86	86
75	15	15	79	66.2	282	276	276	282
76	16	16	129	3.4	134	148	134	134
77	16	16	4	27.3	123	132	123	149
78	16	16	140	42.8	164	150	164	164
79	16	16	153	56.8	194	210	194	
80	16	16	106	71.5	140	148	140	140
81	17	17	164	4.1	126	136	136	126
82	17	17	176	22.5	182	174	172	176
83	17	17	93	44.5	170	156	168	154
84	17	17	96	54.6	135	149	135	149
85	18	18	219	2.0	176	168	168	176
86	18	18	23	21.1	140	144	140	140
87	18	18	33	44.0	136	142	136	140
88	18	18	213	55.1	122	126	122	122
89	19	19	40	25.0	106	112	106	102
90	19	19	119	27.5	276	265	276	283
91	19	19	91	47.0	90	112	134	134

Chemikalien für die SDS-PAGE-Analyse**Probenpuffer**

1 ml Aqua dest
0,25 ml 0,5 M Tris-HCl pH 6,8
0,2 ml Glyzerol
0,4 ml 10% SDS
0,125 ml Bromphenolblau (0,05% in Aqua dest)
0,1 ml 2-b-Mercaptoethanol

0,5 M Tris HCl pH 6,8

6,075 g Trisbase in 60 ml Aqua dest
pH 6,8 einstellen mit 1N HCl
ad 100 ml Aqua dest

1,5 M Tris HCl pH 8,8

18,5 g Trisbase in 80 ml Aqua dest
pH 8,8 einstellen mit 1N HCl
ad 100 ml Aqua dest

Laufpuffer (Stock)

30,3 g Trisbase
144 g Glyzin
ad 1 l Aqua dest

Laufpuffergebrauchslösung

40 ml Stock

40 ml SDS 10%

ad 400 ml Aqua dest

Danksagungen

Herrn Prof. Dr. Eckhard Wolf danke ich für die Überlassung des interessanten Themas und viele konstruktive Anregungen, die zum Gelingen dieser Arbeit beitrugen.

Mein besonderer Dank gilt Frau Dr. Birgit Rathkolb für die hervorragende wissenschaftliche Betreuung und jederzeit gewährte Unterstützung bei Erstellung dieser Arbeit.

Prof. Dr. Aigner und Frau Dr. Mohr danke ich für die gewissenhafte Durchsicht der Arbeit und die Unterstützung bei der korrekten deutschsprachigen Formulierung der Ergebnisse.

Herrn Prof. Dr. Wanke und Frau Dr. Herbach vom Institut für Veterinärpathologie der LMU München danke ich für die Durchführung der histopathologischen Untersuchungen.

Herrn Prof. Dr. Kolb und Frau Dr. Fuchs vom Institut für klinische Chemie des Krankenhauses München-Harlaching sowie Frau Dr. Klempt, von der „German Mouse Clinic“ danke ich für die Kooperation und dem zugehörigen technischen Personal für die Durchführung der klinisch-chemischen Analysen.

Der Firma Medigenomix, insbesondere Herrn Dr. Schubbert danke ich für die sachkundige Kartierung des mutierten Locus.

Dr. Hiendleder danke ich für die Beratung hinsichtlich der statistischen Auswertung meiner Ergebnisse.

Den Tierpflegern und dem technischen Personal der Maushaltung am Moorversuchsgut Badersfeld danke ich für die sachkundige Pflege der Versuchstiere und die Hilfe bei der Probenentnahme und –aufbereitung.

Allen anderen Mitarbeitern des Lehrstuhls für Molekulare Tierzucht und Biotechnologie danke ich für die kollegiale Zusammenarbeit und die vielen im Laufe der vergangenen Jahre gewährten Anregungen und Tipps.

Meinem ehemaligen Chef, Dr. Nguyen Huy Dat, bin ich zu Dank verpflichtet, da seine Unterstützung mir die Promotion in Deutschland erst ermöglicht hat.

Meiner Mutter, meiner Frau und meinem Sohn danke ich dafür, dass sie meinen Wunsch im Ausland zu promovieren unterstützt und mitgetragen haben.

Allen Verwandten, Freunden und Bekannten, die mir während der langen Zeit der Erstellung dieser Arbeit in irgendeiner Weise Beistand geleistet haben und aus Platzgründen hier nicht mehr namentlich erwähnt werden können, an dieser Stelle ein herzliches Dankeschön.

Die finanzielle Unterstützung durch das Deutsche Humangenomprojekt machte die Durchführung dieser Arbeit erst möglich.

Lebenslauf

Name:	Tran Van Tuyen
Geburtsdatum:	15. 04. 1959
Geburtsort:	Quang binh, Vietnam
Eltern:	Vater: Tran Khanh Dan Mutter: Dinh Thi Hua
Familienstand:	Verheiratet
1967-1973	Besuch der Grundschule in Quang binh
1974-1977	Besuch der Oberschule in Quang binh
09-1977 bis 07-1978	Lernen der Deutsche Sprache an der Hochschule für Fremdsprache in Hanoi
09-1978 bis 07-1979	Lernen der Deutsche Sprache am Herder-Institut Leipzig
09-1979 bis 07-1984	Studium der Veterinärmedizin an der Tierärztlichen Fakultät der Universität Leipzig
01-1985 bis 05-2000	Wissenschaftlicher Assistent im Institut für Geflügelkrankheiten in Hanoi, Vietnam
06-2000 bis 11-2003	Anfertigung der vorliegenden Dissertation unter Anleitung von Prof. Dr. B. Aigner und Prof. Dr. E. Wolf (Lehrstuhl für Molekulare Tierzucht und Biotechnologie der Universität München)